

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 6 C07K 14/52, C12N 15/00, 1/21, 1/19, 5/00, C12P 21/02, C07K 16/24		A1	(11) 国際公開番号 WO 95/13293																														
		(43) 国際公開日 1995年5月18日 (18.05.95)																															
(21) 国際出願番号 PCT/JP94/01899 (22) 国際出願日 1994年11月10日 (10. 11. 94)		中村範太 (NAKAMURA, Norio) 〒160 東京都新宿区四谷1丁目7番地 持田製薬株式会社内 Tokyo, (JP)																															
(30) 優先権データ 特願平5/305975 1993年11月10日 (10. 11. 93) JP 特願平5/342526 1993年12月13日 (13. 12. 93) JP 特願平6/74344 1994年3月18日 (18. 03. 94) JP 特願平6/180955 1994年7月8日 (08. 07. 94) JP 特願平6/239363 1994年9月7日 (07. 09. 94) JP 特願平6/278378 1994年10月18日 (18. 10. 94) JP		(74) 代理人 弁理士 渡辺望松, 外 (WATANABE, Mochitoshi et al.) 〒101 東京都千代田区岩本町3丁目2番2号 千代田岩本ビル4階 Tokyo, (JP)																															
(71) 出願人 持田製薬株式会社 (MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) (JP/JP) 〒160 東京都新宿区四谷1丁目7番地 Tokyo, (JP) 財団法人 大阪バイオサイエンス研究所 (OSAKA BIOSCIENCE INSTITUTE) (JP/JP) 〒565 大阪府吹田市古江台6丁目2番4号 Osaka, (JP)		(81) 指定国 AU, CA, CN, JP, KR.																															
(72) 発明者 長田重一 (NAGATA, Shigekazu) 〒565 大阪府吹田市佐井寺2丁目21-17-511 Osaka, (JP) 須田貴司 (SUDA, Takashi) 〒562 大阪府箕面市小野原東3丁目4-20-302 Osaka, (JP) 高橋智裕 (TAKAHASHI, Tomohiro)		添付公開書類 国際調査報告書																															
(54) Title : Fas LIGAND, PART THEREOF, AND DNA CODING FOR THE SAME																																	
(54) 発明の名称 Fas リガンドおよびその一部、およびそれをコードするDNA																																	
<p>(57) Abstract</p> <p>A Fas ligand useful in the medicinal field and a part thereof; a novel DNA coding for the same; an antibody; a recombinant DNA molecule containing the above DNA; a transformant; a method of purifying the novel protein; a process for producing the novel protein; a novel protein antibody; an oligonucleotide complementary to a Fas ligand gene; and a method of screening a substance associated with the Fas ligand.</p>																																	
<p>a</p> <p>PMA+イオノマイシン - + + - +</p> <table border="0"> <tr> <td>d10S</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>d10S</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>d10S-2</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>d10S-16</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>d10S-16</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table> <p>28S ▶</p> <p>18S ▶</p> <p>28S ▶</p> <p>18S ▶</p> <p>Fas-L</p> <p>EF1α</p> <p>a: PMA plus ionomycin</p>				d10S						d10S						d10S-2						d10S-16						d10S-16					
d10S																																	
d10S																																	
d10S-2																																	
d10S-16																																	
d10S-16																																	

(57) 要約

医薬の分野において有用な Fas リガンドおよびその一部、それをコードする新規な DNA、抗体、当該 DNA を含む組換え DNA 分子、形質転換体、当該新規蛋白質の精製方法、および当該新規蛋白質の製造方法、新規な蛋白質の抗体、Fas リガンド遺伝子に相補的なオリゴヌクレオチド、Fas リガンドに関与する物質のスクリーニング方法を提供することを目的とする。

情報としての用途のみ

PCT に基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁に PCT 加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
BB	バルバドス	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SD	スーダン
BE	ベルギー	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BF	ブルキナ・ファソ	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BG	ブルガリア	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BJ	ベナン	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BR	ブラジル	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	ML	マリ	TD	チャド
CA	カナダ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CF	中央アフリカ共和国	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TJ	タジキスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	JP	日本	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NL	オランダ	US	米国
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	NZ	ニュージーランド	VN	ヴェトナム
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	PL	ポーランド		

明 細 書

発明の名称 Fas リガンドおよびその一部、およびそれをコードするDNA

技術分野

本発明は、Fas リガンドおよびその一部、およびそれをコードする新規なDNAを医薬の分野に提供する。本発明は、また、当該新規ポリペプチドを検出するために使用できる抗体を試薬の分野に提供する。さらに、本発明は、当該DNAを含む組換えDNA分子、形質転換体、当該新規ポリペプチドの精製方法、および当該新規ポリペプチドの製造方法、当該DNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、Fas リガンドに関連する物質のスクリーニング法をも提供する。

背景技術

多数の細胞で構成される生体の恒常性は、細胞の増殖と分化およびその死によって巧妙に制御されている。細胞の死は、死につつある細胞の形態から、ネクロシス（壊死）とアポトーシス（自死）に大別される。このうち、ネクロシスとは、一つ以上の細胞あるいは組織や器官の一部分のアクシデンタルな死のことである。ネクロシスを起こした細胞では、細胞膜の破壊、および細胞内容物の細胞外への放出が観察される。一方、アポトーシスとは、生体の恒常性を維持するための細胞死のことである。アポトーシスを起こした細胞では、染色体DNAの断片化、核の濃縮が観察されるが、ネクロシスの場合とは異なり、細胞膜の破壊や細胞内容物の放出は認められない。アポトーシスはプログラム細胞死（programed cell death）の1つの形態であるとも考えられており、例えば、個体発生において不必要な細胞や器官が欠落していく現象は細胞のアポトーシスによるものと考えられている。また、細胞障害性T細胞（CTL）、ナチュラルキラー細胞（NK細胞）、TNF- α やTNF- β などによってウイルス感染細胞や腫瘍細胞

胞が攻撃除去され際の細胞死もアポトーシスであると考えられており、アポトーシスの機能を解明し、生理現象との関係を明らかにするための研究が、多くの研究者によって進められている。

ところで、細胞にアポトーシスを生じさせる物質としてはFas 抗体が知られている。Fas 抗体は、ヒト線維芽細胞でマウスを免疫して得られたモノクローナル抗体である（ヨネハラ S. (Yonehara S.)等、J. Exp. Med.、169巻、1747-1756 頁、1989年）。Fas 抗体によって認識され、アポトーシスのシグナルを細胞に伝達する細胞表面抗原（Fas 抗原）がいかなるものであるかは長年不明であったが、最近、イトウ N. (Itoh N.)等によって、Fas 抗原遺伝子がクローニングされ、Fas 抗原が約45kDの細胞膜上の蛋白質であり、そのアミノ酸配列から TNFレセプターファミリーに属する事が判明した（Cell、66巻、233-243 頁、1991年）。また、マウスFas 抗原遺伝子もクローニングされ（ワタナベフクナガ(Watanabe-Fukunaga R.)等、J. Immunol.、148巻、1274-1279 頁、1992年）、Fas 抗原mRNAが、マウスの胸腺、肝、肺、心臓、卵巣で発現していることが確認された。

Fas 抗原遺伝子のクローニング以後、Fas 抗原を介したアポトーシスと疾患との関係についての研究が進み、種々の報告がされるようになった。

コバヤシ N. (Kobayashi N.) 等は、エイズウイルス感染によりT細胞膜上にFas 抗原の発現が誘導されることを報告し、エイズで見られるT細胞のアポトーシスが、Fas 抗原を介した現象である可能性を示唆している（日経サイエンス、6巻、34-41 頁、1993年）。

オガサワラ(Ogasawara J.)等は、Fas 抗体をマウスに投与することによって、

劇症肝炎に似た現象が起きることを観察し、劇症肝炎などの炎症部位では、Fas 抗原を介したアポトーシスが生じている可能性を示唆した(Nature、364 巻、806-809 頁、1993年)。ヒラマツ(Hiramatsu Y.)等は、慢性C型肝炎の患者で、白血球の浸潤が認められる、肝臓の炎症部位にFas 抗原の発現が高いことを報告した(Hepatology、19 巻、1354-1359 頁、1994年)。

ワタナベフクナガ(Watanabe-Fukunaga R.)等は、自己免疫疾患のモデル動物の1つである lprマウスではFas 抗原遺伝子に変異が生じていること、このような変異の生じたFas 抗原遺伝子を発現している細胞ではアポトーシスが起きないことを証明している。そして、自己免疫疾患では、Fas 抗原もしくはFas 抗原に作用してアポトーシスを起こさせる生体内物質に異常があり、そのため、本来アポトーシスを起こして生体内から除去されるべき自己反応性のT細胞が残存し、自己免疫疾患様の症状が生じるのであろうと予想している(Nature、356 巻、314-317 頁、1993年)。

このように、Fas 抗原が単離され、生体内でFas 抗原が発現し、アポトーシスが惹起されることが確認されたことから、Fas 抗原に結合して細胞にアポトーシスを起こすような物質(以下、Fas リガンドという)が生体内に存在し、Fas 抗原特異的なアポトーシスが起きていることが予想された。

上述のWatanabe-Fukunaga 等は、lprマウスと同様に自己免疫疾患様症状を呈するgld マウスでは、Fas 抗原に結合する生体内分子の方に異常があるのであろうと予想した。

最近、ルービエ E. (Rouvier E.) らは、免疫系においてFas 抗原特異的なアポトーシスが生じていることをより具体的に示した(J. Exp. Med., 177 巻、195-

200 頁、1993年)。すなわち、彼らは、マウス末梢血リンパ球 (PBL)、および、マウス CTLとラット Tリンパ種細胞のハイブリドーマであるPC60-d10S 細胞を使用し、これらの細胞による Ca^{2+} 非依存的な細胞障害作用が、Fas 抗原を発現する細胞に対してのみ認められる事を示した。そして、彼等は、これらのリンパ球細胞、とりわけT細胞がFas 抗原もしくはFas 抗原に関連する何らかの分子を認識しているであろうこと、およびこれらの細胞がFas リガンドを発現しているかもしれないことを指摘している。

Fas 抗原を介したアポトーシスの機構を解明するには、Fas リガンドを単離することが重要である。

上記ルービエ(Rouvier E.)等により、Fas リガンドの存在の可能性が指摘されたが、その実体は何ら明らかにされていない。

前述のように、Fas 抗原と様々な疾患、生理現象との関連が示唆されていることから、Fas リガンドの存在を明らかにし、その実体を把握することは、医療をはじめ、多くの分野で渴望されている。

発明の開示

本発明の目的は、Fas 抗原に結合する新規な蛋白質およびそれをコードする遺伝子を単離し、提供することにある。

Fas 抗原に結合する物質が単離されれば、それを使用して、人為的に生体内で生じるアポトーシスを調節し、疾患の治療や、診断に使用する事ができる。Fas 抗原に結合して細胞にアポトーシスを誘導するような物質 (Fas リガンド) は、生体にとって不必要な細胞を除去するために使用することが可能である。たとえば、先述したように、エイズウイルス感染細胞ではFas 抗原が発現されているの

で、エイズウイルス感染初期においては、Fas リガンドを使用してアポトーシスを人工的に誘導し、感染細胞を早期に除去する事により、エイズを治療する事が可能であろう。また、ある種の自己免疫疾患では、人為的にFas 抗原を介したアポトーシスを生じさせる事により、自己抗原反応性のT細胞の除去が可能になるであろう。また、モリモト H. (Morimoto H.)等は、癌細胞にFas 抗原を介したアポトーシスを誘導する事によって、アドリアマイシンやシスプラチンによる制癌効果が相乗的に増強されることを報告している (Cancer Res., 53 巻、2591-2596 頁、1993年) ので、Fas リガンドは癌治療にも使用することができるであろう。

一方、エイズウイルス感染後期の免疫能の低下や、劇症肝炎における肝機能低下は、免疫担当細胞あるいは肝細胞のアポトーシスにより組織の機能が著しく低下した結果と考えられる。このような状態においては、Fas リガンドの作用を抑制し、細胞のアポトーシスを防ぐことが必要になる。したがって、このような病態には、Fas リガンドの発現を抑制する物質やFas リガンドと拮抗的に作用する物質を使用した治療が必要である。

このように、生体内で生じているアポトーシスを人為的に調節するという原理に基づいた治療方法は、Fas リガンドが同定されて初めて可能になる方法である。

Fas 抗原と結合する蛋白質を、治療や研究に使用するためには、当該蛋白質を高純度で、大量に生産することが必要になる。当該蛋白質をコードする遺伝子をクローニングすれば、当該蛋白質を遺伝子工学的に生産することが可能になり、当該蛋白質を治療薬の主成分として使用したり、抗体の作製に使用することが可

能になる。また、遺伝子そのものは、遺伝子治療やアンチセンス医薬の開発に使用したり、トランスジェニックマウス等、アポトーシスが関与する疾患のモデル動物の作製に使用することができる。

本発明者らは、Fas リガンドを単離すべく鋭意研究を重ねてきた。そして、上述したPC60-d10S 細胞に着目した。PC60-d10S はマウスCTL とラットTリンパ腫とのハイブリドーマで、PMA（ホルボールミリステートアセテート）とイオノマイシンで刺激するとFas 抗原発現細胞に対してのみアポトーシスを誘導する細胞である。本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、無刺激でも、より高い細胞障害作用を示す、Fas リガンド遺伝子をクローニングするのに適した細胞集団、PC60-d10S-2 を得る事に成功した。そして、この細胞集団より、ラットFas リガンド遺伝子をクローニングした。また、本発明者らは医薬品等に使用するのに適したヒト由来のFas リガンドを単離することを目的として研究を重ね、ついにヒトFas リガンドをコードする遺伝子を得ることに成功した。さらに、マウスFas リガンドをコードする遺伝子を得る事にも成功し、これらの配列が互いに類似すること、部分的に共通の配列を有することを確認した。さらに、Fas リガンドの活性に必要と思われる部分を特定し、本発明を完成させたものである。

すなわち、本発明第1の態様は、Fas リガンドのアポトーシスを誘導する活性を有するポリペプチドを提供する。

本発明第2の態様は、Fas リガンドであるポリペプチドの一部を提供する。

本発明第3の態様は、本発明第1または第2の態様の新規ポリペプチドをコードする塩基配列を有することを特徴とする新規DNA である。

本発明第4の態様は、本発明第3の態様のDNA を含むことを特徴とする組み換

えDNA 分子である。

本発明第 5 の態様は、本発明第 3 の態様の新規DNA で形質転換されたことを特徴とする形質転換体である。

本発明第 6 の態様は、本発明第 4 の態様の組み換えDNA 分子で形質転換されたことを特徴とする形質転換体である。

本発明第 7 の態様は、本発明第 5 または第 6 の態様の形質転換体を用いることを特徴とする本発明第 1 または第 2 の態様の新規ポリペプチドの製造方法である。

本発明第 8 の態様は、本発明第 1 または第 2 の態様の新規ポリペプチドの精製方法である。

本発明第 9 の態様は、本発明第 1 または第 2 の態様の新規ポリペプチドを認識することを特徴とする新規抗体である。

本発明第10の態様は、Fas リガンド遺伝子またはFas リガンドに対するmRNAの一部に相補的な塩基配列を含むことを特徴とするオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体である。

本発明第11の態様は、本発明第 1 または第 2 の態様の新規ポリペプチドもしくはそれを発現する形質転換体を使用することを特徴とするFas 抗原もしくはFas リガンドに関連する物質のスクリーニング方法である。

図面の簡単な説明

図 1 は、それぞれd10S、d10S-2、及びpTN24-15で形質転換させたCOS-7 細胞のフローサイトメトリーの解析結果、a, b, cを示す図である。

図 2 は、クローンpTN24-15中の塩基配列および推定されるアミノ酸配を示す図

である。

図 3 は、クローン pTN24-15 中の塩基配列および推定されるアミノ酸配を示す図である。

図 4 は、d10S、d10S-2、d10S-16 のノーザンハイブリダイゼーションの結果を示す図である。

図 5 は、ラット脾細胞と胸腺細胞とを用いたノーザンハイブリダイゼーションの結果を示す図である。

図 6 は、ラット各組織のノーザンハイブリダイゼーションの結果を示す図である。

図 7 は、d10S-12 及び pTN24-15 で形質転換した COS-7 細胞の免疫沈降の結果を示す図である。

図 8 は、W4、WR19L を標的細胞としたときの d10S 細胞の細胞障害活性を示す図である。

図 9 は、W4、WR19L を標的細胞としたときの pTN24-15 で形質転換した COS-7 細胞、pCEV4 で形質転換した COS-7 細胞の細胞障害活性を示す図である。

図 10 は、W4、WR19L を標的細胞としたときの pTN24-15 で形質転換した COS-7 細胞、pCEV4 で形質転換した COS-7 細胞の細胞障害活性を示す図である。

図 11 は、W4 細胞に対する d10S 細胞及び pTN24-15 で形質転換した COS-7 細胞の細胞障害作用の mFas-Fc による阻害を示す図である。

図 12 は、pTN24-15 で形質転換した COS-7 細胞をエフェクター細胞とし、W4 細胞を標的細胞としたときの、標的細胞における染色体 DNA の変化を示すゲル電気泳動を示す図である。

図13は、精製したFas リガンドの10-20%グラジエントSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示す図である。

図14は、W4及びWR19L 細胞を標的細胞としたときの精製Fas リガンドの細胞障害活性を示す図である。

図15は、プラスミドpBL-hFL4H 中の塩基配列及び推定されるアミノ酸配列を示す図である。

図16は、ヒトFas リガンド染色体遺伝子の塩基配列を示す図である。

図17は、ヒトFas リガンド染色体遺伝子の塩基配列を示す図である。

図18は、ヒトFas リガンド染色体遺伝子の塩基配列を示す図である。

図19は、クローンpBX-hFL1中の塩基配列を示す図である。

図20は、クローンpBX-hFL1中の塩基配列を示す図である。

図21は、pEX-hFL1で形質転換させたCOS 細胞およびpEF-MFLW4Fで形質転換させたCOS 細胞をエフェクター細胞とし、WR19L およびWC8Aを標的細胞とした時の特異的細胞溶解率を示す図である。

図22は、hFas-Fc およびmFas-Fc による、pEX-hFL1で形質転換させたCOS 細胞のWC8A細胞に対する細胞障害活性の阻害を示す図である。

図23は、クローンpBL-MFLW4 中の塩基配列を示す図である。

図24は、クローンpBL-MFLW4 中の塩基配列を示す図である。

図25は、pEF-MFLW4Fで形質転換させたCOS 細胞をエフェクター細胞とし、WR19L およびW4を標的細胞とした時の細胞障害活性を示す図である。

図26は、gld マウスより単離したFas リガンドcDNAを含むプラスミドで形質転換させたCOS 細胞をエフェクター細胞とし、WR19L およびW4を標的細胞とした時

の細胞障害活性を示す図である。

図27は、微生物の形態を表す図面代用写真であって、抗血清19-3とヒトFas リガンド発現細胞を用いたウエスタンブロッティングの結果を示す図面代用写真である。

図28は、微生物の形態を表す図面代用写真であって、モノクローナル抗体F864-5-1とヒトFas リガンド発現細胞を用いたウエスタンブロッティングの結果を示す図面代用写真である。

図29は、モノクローナル抗体F883-1-1のペプチドとの反応性を示す図である。

図30は、モノクローナル抗体F883-1-1のアポトーシス抑制活性を示す図である。

図31は、モノクローナル抗体F897-1-2のペプチド③との反応性を示す図である。

図32は、モノクローナル抗体F897-1-2のアポトーシス抑制活性を示す図である。

図33は、WC8 およびW4を標的細胞とした時の形質転換体COS-1/pM1070の培養上清の細胞障害活性を示す図である。

図34は、WC8 およびW4を標的細胞とした時の、形質転換体COS-1/pEX-hFL1の培養上清の細胞障害活性を示す図である。

図35は、微生物の形態を示す図面代用写真であり、非還元条件下における、形質転換体COS-1/pM1070の培養上清のウエスタンブロッティングの結果を示す。

図36は、微生物の形態を示す図面代用写真であり、非還元条件下における形質

転換体COS-1/pEX-hFL1の培養上清のウェスタンブロッティングの結果を示す。

図37は、アンチセンスオリゴヌクレオチドA41のアポトーシス抑制活性を示す図である。

図38は、アンチセンスオリゴヌクレオチドA69, A184, A355, A505, A733, A924 のアポトーシス抑制活性を示す図である。

図39は、各培養上清中のポリペプチドND38、ND40、ND41、ND42、ND43およびCD179 の細胞障害活性を示す図である。

図40は、微生物の形態を示す図面代用写真であって、形質転換体JE5505 (pM1068)の菌体および培養上清のウェスタンブロッティングの結果を示す。

図41は、微生物の形態を示す図面代用写真であって、形質転換体JE5505 (pM1069)の菌体および培養上清のウェスタンブロッティングの結果を示す。

発明の概要

以下に詳細に本発明を説明する。

まず、本発明第1の態様について説明する。

本明細書中の説明において、「式X（もしくは配列番号X）に記載のアミノ酸配列を含有するポリペプチド」とは、そのポリペプチドのアミノ酸配列が、式Xもしくは配列番号Xに記載されたアミノ酸配列であるか、式Xもしくは配列番号Xのアミノ酸配列のN末端、C末端のいずれか一方、もしくはその両方に、任意の1つ以上のアミノ酸が付加してなるアミノ酸配列であることを意味する。また、「式X（もしくは配列番号X）に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド」とは、そのポリペプチドのアミノ酸配列が、実質的に、式Xもしくは配列番号Xに記載のアミノ酸配列であることを意味する。

また、本明細書中の説明において、「Fas リガンド」とは、少なくともその活性として、Fas 抗原を発現する細胞に対してアポトーシスを誘導する活性を有する物質のことである。Fas リガンドによるアポトーシスの誘導は、Fas リガンドが細胞表面のFas 抗原に結合し、Fas 抗原を介して、アポトーシスのシグナルが細胞に伝達されるためと考えられている。ここでいうFas 抗原はいかなる動物種由来のFas 抗原であってもよい。例えば、ヒトFas 抗原であれば、イトウ等によりアミノ酸配列が決定されており、マウスFas 抗原であればワタナベフクナガ等によりアミノ酸配列が決定されており、ラットFas 抗原であれば、キムラ等により、アミノ酸配列が決定されている（イトウ N. (Itoh N.)等、Cell, 66巻、233-243 頁、1991年、ワタナベフクナガ R. (Watanabe-Fukunaga R.) 等、J. Immunol., 148巻、1274-1279 頁、1992年、キムラ K. (Kimura K.)等、Biochem. Biophys. Res. Commun., 198 巻、666-674 頁、1994年）。

本発明第1の態様のFas リガンドのアポトーシス誘導活性を有する新規ポリペプチドは、式1ないし12（配列表の配列番号1ないし12）いずれかに記載のアミノ酸配列を含むことを特徴とする。

このうち、前記式1ないし4は、ヒト細胞より得られたFas リガンドのアミノ酸配列であり、前記式5ないし8はラット細胞より得られたFas リガンドのアミノ酸配列である。また、前記式9ないし12はマウス細胞より得られたFas リガンドのアミノ酸配列である。

前記式4、8、12のアミノ酸配列は、いずれも、細胞内領域、膜貫通領域、細胞外領域を含んでいることから、これらのポリペプチドは、生体内においては細胞表面ポリペプチドとして存在していると考えられる。従って、これらのアミノ

酸配列を有するポリペプチドを得るためには、これらを発現している細胞や組織から精製する必要がある。ところで、このような細胞表面上に存在するポリペプチドの細胞外領域は、細胞膜から切断、遊離され、それを生産する細胞の培養上清中や、尿や血液等の体液中に存在することが多い。一般に、ポリペプチドの精製は、細胞や組織から精製する場合と、培養上清や尿から精製する場合とでは、後者の方が効率的であり収量も多い。従って、Fas リガンドにおいても、細胞外領域の方が、その生産性の面で、都合がよい。

本発明では、このようなFas リガンドの細胞外領域も本発明のFas リガンドのアポトーシス誘導活性を有するポリペプチドとして提供する。細胞外領域が細胞膜から切断される部位は、それを生産する細胞の培養条件や細胞内外のプロテアーゼの影響により、多様性が生じることもある。しかしながら、本発明において提供されるFas リガンドの細胞外領域の好ましい例は、前記式 3、7、11のいずれかのアミノ酸配列を有するポリペプチドである。これらはそれぞれヒト、ラット、マウスのFas リガンドの細胞外領域のアミノ酸配列に相当する。前記式 3 の配列は、前記式 4 のアミノ酸配列のN末端より数えて第103 番目から281 番目に相当し、前記式 7 の配列は前記式 8 のアミノ酸配列のN末端から数えて第100 番目から278 番目に相当する。また、前記式11の配列は前記式12のアミノ酸配列のN末端から数えて第101 番目から279 番目に相当する。

本発明のFas リガンドのアポトーシス誘導活性を有するポリペプチドは、好ましくは、Fas リガンドの細胞外領域である。

ところで、周知のとおり、ポリペプチドを組み換えDNA 技術を使用して製造する場合には、低分子量のポリペプチドの方が発現量が高く、より高い生産効率が

期待できる。また、活性に必要な部分のみを有しているポリペプチドは、余分な配列を有しているポリペプチドに比べ、生体に対する抗原性が低いことが期待される。加えて、低分子量のポリペプチドであれば、他の活性を有するポリペプチドと融合させて新たな活性を付加させたり、抗体と結合させて特定の細胞にのみ作用させる等の修飾が容易である。本発明は、このように、生産性、抗原性等の点で有用性が期待できるより低分子のポリペプチドとして、前記式 1、5、9 のいずれかのアミノ酸配列を有するポリペプチドを提供する。また、本発明は、前記式 2、6、10 のいずれかのアミノ酸配列を有するポリペプチドを提供する。

前記式 1、2、5、6、9 および 10 は、ヒト、ラットおよびマウスの細胞外領域部分のアミノ酸配列の一部を表すものである。

すなわち、前記式 1、5、9 のアミノ酸配列は、それぞれ、前記式 3、7、11 のアミノ酸配列の N 末端から 42 アミノ酸が欠損した配列である。また前記式 2、6、10 のアミノ酸配列は、それぞれ、前記式 3、7、11 のアミノ酸配列の N 末端から 41 アミノ酸が欠損した配列である。実施例からも明らかなように、細胞外領域のアミノ酸配列である前記式 3 の N 末端から 42 アミノ酸、41 アミノ酸を欠損したアミノ酸配列（それぞれ、前記式 1、式 2）のアミノ酸配列を有するポリペプチドであってもアポトーシス誘導活性を有している。また、前記式 3 の N 末端から 40 アミノ酸、38 アミノ酸、34 アミノ酸を欠損したアミノ酸配列を有するポリペプチドであっても、アポトーシスを誘導する活性を有している。

このことは、細胞外領域の N 末端から 43 番目以降のアミノ酸配列がアポトーシス誘導活性には必要であり、このアミノ酸配列、すなわち前記式 1、5、9 いずれかに記載のアミノ酸配列をその一部に含有するポリペプチドは、アポトーシス

誘導活性を有していること、および欠損するアミノ酸の数によってアポトーシスを誘導する活性に差があることを示唆している。従って、本発明の新規ポリペプチドは、前記式 1、5、9 のいずれかのアミノ酸配列を含有するものとして特徴づけられる。

本発明第 1 の態様のポリペプチドの中で、ヒト由来の Fas リガンドの細胞外領域である前記式 3 のアミノ酸配列の N 末端から 1 ないし 42 いずれかの数のアミノ酸が欠如したアミノ酸配列を有するポリペプチドは、いずれも、他の動物種から得られた Fas リガンドに比べてヒトに対する抗原性が低く、形質転換体において適当なシグナルペプチドをつけて発現させれば、形質転換体の培養上清から回収でき、低分子化されているので優れた生産性が期待される。なかでも、前記式 3 の N 末端から 40 アミノ酸を欠損したアミノ酸配列を有するポリペプチド、および前記式 3 の N 末端から 34 アミノ酸を欠損したアミノ酸配列を有するポリペプチドは、活性の面からも好ましいポリペプチドである。

一般にポリペプチドは、種の違い、個体の違いによって、その基本的な機能が保持れたまま、アミノ酸配列に変異が生じる場合がある。ここでいうアミノ酸の変異とは、アミノ酸配列中の 1 つ以上のアミノ酸が、欠失したり、他のアミノ酸に置換されたりすること、および、アミノ酸配列中の任意の位置に 1 つ以上のアミノ酸が挿入もしくは付加されたりすることである。このような変異は、遺伝子工学的な技術を使用し、人工的に生じさせることも可能である。従って、ポリペプチドが、前記式 1 ないし 12 に記載のいずれかのアミノ酸配列に上記のような変異が生じたアミノ酸配列を含有するものであっても、それが、前記式 1 ないし 12 のアミノ酸配列を有するポリペプチドと同様の性質を有する限り、本発明のポリ

ペプチドに含まれる。

一般に、同一の機能を有するポリペプチドに対するDNA は、動物種や個体が異なっても互いに相同性があり、互いにハイブリダイズすることが多い。アミノ酸の多様性も、それらをコードするDNA が互いにハイブリダイズする範囲で生じることが多い。例えば実施例で示したハイブリダイゼーション法によるDNA のクローニングは、前記式3または11のアミノ酸配列をコードするDNA が、前記式7のアミノ酸配列をコードするDNA とハイブリダイズすることを示している。そして、前記式3のアミノ酸配列を有するポリペプチドは、ヒトFas 抗原に加え、少なくとも、マウスFas 抗原に結合する。前記式7のアミノ酸配列を有するポリペプチドは、ラットFas 抗原に加え、少なくともマウスFas 抗原にも結合する。前記式11のアミノ酸配列を有するポリペプチドは、マウスFas 抗原に加え少なくともヒトFas 抗原にも結合する。このように、互いにハイブリダイズするDNA によってコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、実質的に同一の機能を有すると考えられる。

従って、本発明の新規ポリペプチドは、前記式1ないし12、より好ましくは前記式1、5、9のいずれかのアミノ酸配列をコードする塩基配列に相補的な塩基配列にハイブリダイズする塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を含有するものとしても特徴づけることができる。本発明の新規ポリペプチドは、好ましくは、この特徴に加え、少なくともヒトFas 抗原、ラットFas 抗原、マウスFas 抗原のいずれかに結合するものであり、さらに好ましくはアポトーシス誘導活性を有するものである。

つぎに、本発明第2の態様の新規ポリペプチドについて説明する。

本発明第2の態様の新規ポリペプチドは、Fas リガンドの一部およびそれらの融合体である。本発明の第2の態様のポリペプチドは、好ましくは、前記式4、8、12いずれかに記載のアミノ酸配列の一部からなるポリペプチドおよびそれらポリペプチドを2種以上融合させてなる融合体である。

前記式4、8、12いずれかに記載のアミノ酸配列の一部からなるポリペプチドとは、いかなる長さのポリペプチドであってもよい。しかながら、当該ポリペプチドが、前記式4、8、12に特徴的な配列を有するためには、当該ポリペプチドは、好ましくは、5アミノ酸以上、さらに好ましくは10アミノ酸以上のアミノ酸からなるポリペプチドである。

本発明第2の態様のポリペプチドは、Fas 抗原に結合する物であっても、しない物であってもよい。本発明第2の態様のポリペプチドが、Fas 抗原に結合し、かつアポトーシスを誘導しない場合には、生体内のFas リガンドに拮抗する物質として、アポトーシスを人為的に抑制するために使用することができる。また、本発明第2の態様のポリペプチドは、実施例に示すように、それが、Fas 抗原に結合するかしないかに関わらず、また、アポトーシスを誘導するかしないかに関わらず、本発明第1の態様の新規ポリペプチドに対する抗体作成するための抗原として使用することができる。

前記式4、8、12いずれかに記載のアミノ酸配列の一部からなるポリペプチドを2種以上融合させてなるポリペプチドとは、前記式4、8、12に記載のアミノ酸配列の一部からなるポリペプチドより選ばれる、任意の2つ以上のポリペプチドが任意の順番で融合したポリペプチドである。例えば、前記式4に記載のアミノ酸配列の一部からなるポリペプチド同士を融合させたもの、前記式4の一部か

らなるポリペプチドと前記式 8 の一部からなるポリペプチドを融合させたもの等が本発明に含まれる。このような融合ポリペプチドの例としては、前記式 3 のアミノ酸配列の N 末端から数えて 50 番目のアミノ酸から 179 番目までのアミノ酸までの配列に加えて、その N 末端に、前記式 7 のアミノ酸配列の 1 番目のアミノ酸から 49 番目のアミノ酸までの配列、もしくは前記式 11 のアミノ酸配列の 1 番目のアミノ酸から 49 番目のアミノ酸までの配列を有するポリペプチドが挙げられる。これらのポリペプチドは、それぞれ、ヒト由来 Fas リガンドとラット由来 Fas リガンドのキメラ型ポリペプチド、ヒト由来 Fas リガンドとマウス由来 Fas リガンドのキメラ型ポリペプチドであり、Fas 抗原を誘導する細胞に対してアポトーシスを誘導することが期待されるものである。

上述の融合ポリペプチドは、組み換え DNA 技術を使用して作製することができる。すなわち、それぞれのポリペプチドをコードする DNA をライゲーションさせて、目的のキメラ型 Fas リガンドをコードする DNA を作製する。これを適当な発現ベクター組み込んで宿主細胞を形質転換させ、形質転換体もしくはその培養上製から目的のキメラ型 Fas リガンドを回収する。

通常、同一の機能を有する蛋白質をコードする DNA の塩基配列は、動物種や個体が違って、互いにホモロジーを有していることが多い。従って、「配列番号 13 ないし 24 (式 13 ないし 24) いずれかの塩基配列中の任意の一つ以上の塩基に変異が生じた塩基配列」とは、前記式 13 ないし 24 より選択されるいずれかの塩基配列の少なくとも一部とホモロジーのある配列、すなわち、前記式 13 ないし 24 より選択されるいずれかの塩基配列に相補的な配列の少なくとも一部とハイブリダイズする塩基配列を有する DNA であることが好ましい。ここで「ハイブリダイズす

る」とは、前記式13ないし24のいずれかの塩基配列に相補的な配列の一部をプローブとして、公知の方法（例えば、サムブルック J. (Sambrook J.)等、Molecular Cloning, a Laboratory Manual 2nd ed., 1989 年、Cold Spring Harbor Laboratory, ニューヨーク(New York)、参照）でハイブリダイゼーションを行った場合にハイブリダイズすることをいう。

本発明の第1および第2の態様の新規ポリペプチドには、糖鎖を有するもの、有さないものいずれもが含まれる。

前記式4および8で示したアミノ酸配列には、それぞれ4ヶ所の糖鎖付加可能部位（N-グリコシレーションサイト）がある。すなわち、前記式4においては、アミノ酸番号76～78、184～186、250～252、260～262が、前記式8においてはアミノ酸番号116～118、130～132、247～249、257～259が糖鎖付加可能部位に相当する。また、前記式12のアミノ酸配列には5ヶ所のN-グリコシレーションサイトがある（アミノ酸番号117～119、131～133、182～184、248～250および258～260）。

従って、当該ポリペプチドが動物細胞によって生産されたものであったり、遺伝子工学的に酵母や動物細胞等の真核細胞を宿主として生産させたものであったりした場合には、糖鎖が付加される可能性がある。一方、大腸菌等の原核細胞を宿主として遺伝子工学的にポリペプチドを生産させた場合には、当該新規ポリペプチドは糖鎖を持たない。

本発明第1および第2の態様のポリペプチドは、糖鎖の有無にかかわらず有用である。例えば、当該ポリペプチドは、糖鎖の有無にかかわらず、本発明第9の態様の抗体を作成する際の抗原として使用したり、当該ポリペプチドに結合する

物質のスクリーニングに使用することができる。

本発明第1および第2の態様の新規ポリペプチドはいかなる方法で生産されたものであってもよい。例えば、ペプチド合成機（例えば、ペプチドシンセサイザー430A型、パーキンエルマー・ジャパン（株）製）を使用して化学合成したもので、ヒトおよびヒト以外のいかなる生物の組織や細胞、体液から精製されたものであってもよい。ヒトや動物の体液としては、血液や尿があげられる。細胞としては、本発明の新規ポリペプチドを産生する細胞を適宜選択して用いることができる。例えば、脾細胞や胸腺細胞、リンパ球系細胞、および、それらの株化細胞などを、ノーザンブロットあるいはウエスタンブロット等で解析し、本発明の新規ポリペプチドの発現量の高いものを選択する。

必要があれば、細胞をPMA（ホルボールミリステートアセテート）やイオノマイシン、PHA（フィトヘムアグルチニン）、ConA（コンカナバリンA）、IL-2（インターロイキン-2）等の刺激剤から選ばれる、1種もしくは2種以上の適切な刺激剤で刺激して産生誘導する。そして、細胞もしくは培養上清から、当該ポリペプチドを精製する。精製は、濃縮や、各種クロマトグラフィー、塩析など一般的に行われているポリペプチドの精製方法を適宜組み合わせ、Fas 抗原への結合性、もしくは、Fas 抗原を発現している細胞への細胞障害活性等を指標として行うことができる。精製方法の好ましい例は、第8の態様で説明する。

しかしながら、当該新規ポリペプチドは、その純度の面から、遺伝子工学的に生産されたもの、すなわち、組換え型ポリペプチドであることが好ましい。当該ポリペプチドを遺伝子工学的に生産するには、後述する本発明第3の態様の新規DNA、もしくは第4の態様の組換えDNA分子を用いて、適当な宿主細胞を形質転

換し、得られた形質転換体を培養して培養混合物を回収し、当該ポリペプチドを精製する。また、該DNA や組換えDNA 分子を利用して無細胞系の合成方法（サムブルック J. (Sambrook, J.) et al.: Molecular Cloning 2nd ed. (1989 年)）で得る方法も、遺伝子工学的に生産する方法の 1 つである。

遺伝子工学的に本発明の新規ポリペプチドを製造する好ましい方法については本発明第 7 の態様で説明している。

近年の技術により、ポリペプチドをポリエチレングリコールや、スチレン-マレイン酸コポリマー、デキストラン、ピランコポリマー、ポリリジン等の高分子に結合させたり、多糖類やポリペプチドなどの天然高分子、ホルモンなどの生理活性物質、マグネタイトなどの無機物質に結合させたりすることが可能になった（例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84巻, 1487-1491 頁 (1981年)、Biochemistry 28巻, 6619-6624頁 (1989年)）。

ポリペプチドにポリエチレングリコールを結合させる方法の一例を簡単に説明する。まず、ポリペプチドをそれが活性を失わないような範囲の塩基性 pH を有する緩衝液に溶解する。その溶液に、メトキシポリエチレングリコールスクシンイミジルサクシネートのような活性化ポリエチレングリコールを混合し、室温で一定時間反応させる。その後、ゲルろ過等によって、活性を有するフラクションを分取する。本発明第 1 および第 2 の態様の新規ポリペプチドも公知方法の組み合わせにより、このような修飾が可能である。従って、本発明第 1 および第 2 の態様の新規ポリペプチドには、上述のような修飾を受けたものも包含される。

一般に、ポリペプチドは生体や、培養液中で、共有結合によりもしくは共有結合によらずに複数の分子が結合した多量体を形成することがある。多量体の形成

は、同じ分子同士が結合して多量体を形成することもあるし、ことなる分子同士が結合して多量体を形成することもある。例えば、TNF は3量体を形成することが知られている。また、アクチビンは2量体を形成することが知られている。

本発明の第1および第2の態様のポリペプチドは、単量体であってもよいし、多量体を形成していても良い。例えば、本発明のポリペプチドは、前記式1ないし12いずれかのアミノ酸配列を有するポリペプチドが互いに結合して、3量体を形成していてもよい。

本発明第1および第2の態様の新規ポリペプチドは、生体内で生じるアポトーシスを調節するために使用することができる。

例えば、Fas 抗原に結合し、アポトーシスを誘導する、前記式1ないし12のいずれかのアミノ酸配列を有するポリペプチドに代表される本発明の新規ポリペプチドは、薬剤耐性となった癌を治療するために使用することができる。また、これらは、HIV ウイルスが感染した細胞に対し、アポトーシスを人為的に誘導し、AIDSの感染初期の治療薬となり、新しい治療方法を医療の分野に提供する事ができる。

一方、本発明第2の態様の新規ポリペプチドのうち、Fas 抗原に結合するがアポトーシスを誘導しないポリペプチドは、肝炎等の重篤な感染症となった時に感染細胞がアポトーシスを起こすのを防ぎ、肝臓等の主要組織の細胞の急激な減少を防止することによって、組織機能の低下を予防することができる。

本発明の新規ポリペプチドを医薬品として使用する場合には、ポリペプチドを有効成分として含む通常の医薬組成物の製造方法に準じて、注射剤、錠剤、カプセル剤、座剤、噴霧剤、クリーム剤、パップ剤、点眼剤等、適当な剤型の医薬組

成物を製造する。例えば、注射剤であれば当該新規ポリペプチドを含む溶液を無菌状態で調製し、必要があれば、安定化剤等の補助成分を加えてアンプルに充填し、凍結乾燥することにより、当該新規ポリペプチドを有効成分とする医薬組成物を製造することができる。このようにして得られた医薬組成物は、使用時に、注射用蒸留水等に溶解して静脈内や局所へ投与することができる。医薬組成物の有効成分としては、本発明の新規ポリペプチドの中でもヒトに対する抗原性が最も低い、前記式 1 ないし 4 のアミノ酸配列を含有するポリペプチド、特に前記式 1 ないし 4 のアミノ酸配列を有するポリペプチド、もしくは、それらの一部を有するポリペプチドを使用することが好ましい。

本発明のポリペプチドは、患者の年齢や、性別、疾患の種類、程度に応じて、その投与方法、その投与量を設定して使用することができる。すなわち、アポトーシスを調節し、病態を改善するのに適した量を、経口投与、あるいは、吸入、経皮投与、点眼、腔内投与、関節内投与、直腸投与、静脈内投与、局所投与、筋肉内投与、皮下投与、腹腔内投与等から適当な方法を選んで投与すればよい。

本発明第 1 および第 2 の態様の新規ポリペプチドは、また、抗体を得るための材料として使用することもできる。すなわち、本発明の新規ポリペプチドをウサギなどの動物に投与して、本発明のポリペプチドに対する抗体を作成する。抗体の作製法については、第 9 の態様で説明する。得られた抗体は、組織や細胞の染色に使用したり、当該新規ポリペプチドを精製するためアフィニティーカラムの作製に使用することができる。

次に本発明の第 3 の態様の新規 DNA を説明する。

本明細書の説明において「式Y（もしくは配列番号Y）の塩基配列を含有するDNA」とは、DNAが、式Y（もしくは配列番号Y）で表されるものであっても、式Y（もしくは配列番号Y）に記載された塩基配列の5'末端、3'末端のいずれか一方、もしくは両方に任意の1つ以上の塩基が付加した配列で表されるものであってもよいことを意味する。ここで、付加される塩基は、コーディングフレームにずれを生じさせない限りいかなるものであってもよく、例えば、リンカー配列、シグナルペプチドをコードする塩基配列、他の蛋白質をコードする塩基配列、もしくはDNAプローブ等を作製する際にその検出感度の増加を目的として付加される配列等が例として挙げられる。また、「式Y（もしくは配列番号Y）の塩基配列を有するDNA」とは、そのDNAが実質的に、式Y（もしくは配列番号Y）に記載の塩基配列で表されるものであることを意味する。

本発明第3の態様の新規DNAは、Fasリガンドに対するDNAおよびその一部を含有する。

すなわち、本発明第3の態様の新規DNAは、本発明第1および第2の態様の新規ポリペプチドをコードする塩基配列を含有する。本発明の新規DNAは、好ましくは、前記式1ないし12（配列表の配列番号1ないし12）のいずれかのアミノ酸配列もしくはその一部をコードする塩基配列を含有する。

一般に、アミノ酸をコードするDNAのトリプレットは、アミノ酸の種類ごとに1～6種類迄存在することが知られているので、前記配列番号1ないし12いずれかに記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列は1種類には限定されない。したがって、本発明のDNAは、それが前記1ないし12のいずれかに記載のアミノ酸配列もしくはその一部をコードする限り、いかなる配列からなるDNAであってもよ

い。

しかしながら、好ましくは、本発明の新規DNA は、前記式13ないし24のいずれかに記載の塩基配列もしくは前記式13ないし24（配列表の配列番号13ないし24）のいずれかに記載の塩基配列の一部を含有するDNA である。前記式16、20、24に記載の塩基配列はそれぞれヒト、ラット、マウス由来のFas リガンドのアミノ酸配列である前記式4、8、12に記載のアミノ酸配列をコードするものである。前記式15、19、23に記載の塩基配列は、それぞれ、前記式4、8、12に記載されたFas リガンドの細胞外領域部分である前記式3、7、11に記載のアミノ酸配列をコードするものである。前記式13、14、17、18、21、22に記載の塩基配列はそれぞれ、上記ヒト、ラットまたはマウスFas リガンドの細胞外領域のより短い領域である前記式1、2、5、6、9、10のアミノ酸配列をコードするものである。

本発明のDNA は、それが本発明第1または第2の態様の新規ポリペプチドをコードする塩基配列を含有する限り、cDNAであっても染色体DNA であってもよい。しかしながら、ベクターへの導入の容易さ等、遺伝子工学的手法における扱い易さから、本発明の新規DNA はcDNAであることが好ましい。染色体DNA の一例としては、前記式13ないし16の塩基配列を含有する染色体DNA の塩基配列を図16～18に示してある。

本発明のDNA は、本発明第1または第2の態様の新規ポリペプチドを、組み換えDNA 技術を使用して製造するために有用である。すなわち、本発明のDNA を、プロモーター配列等の発現に必要な配列を有する適当な発現ベクターの適当な位置に挿入し、このベクターで適当な宿主細胞を形質転換することによって、形質

転換体に本発明第 1 または第 2 の態様の新規ポリペプチドを発現させることができる。例えば、実施例にも示したように、前記式 16、20、24 の塩基配列を含有する組換え DNA 分子で形質転換させた形質転換体の培養上清中には、アポトーシスを誘導する活性を有するポリペプチド、すなわち Fas リガンドが遊離される場合がある。Fas リガンドはこのような形質転換体もしくはその培養上清から、回収することができる。

特に、前記式 13、14、15、17、18、19、21、22、23 のいずれかに記載の塩基配列を有する DNA は、アポトーシスを誘導する活性を有するより低分子のポリペプチドを生産するために適している。これらの塩基配列は、ヒト、ラットおよびマウスの Fas リガンドの細胞外領域部分またはその一部のアミノ酸配列をコードする塩基配列を表すものである前記式 1、2、3、5、6、7、9、10、11 のアミノ酸配列をコードしているので、適当なシグナルペプチドをコードする塩基配列の下流に、これらのいずれかの塩基配列を有する DNA を接続して発現させると、その培養上清中に前記ポリペプチドが分泌されるからである。

既に説明したように、ポリペプチドの精製においては、細胞のライセートから精製するよりも、培養上清から精製する方が効率的である。前記式 13、14、15、17、18、19、21、22、23 のいずれかに記載の塩基配列を有する DNA は、上記利点に加え、低分子であるために、遺伝子工学的手法において扱いやすいという点でも利用価値が高い。

先述したように、同一の機能を有するポリペプチドであっても、種差や個体差によってアミノ酸配列や、それをコードする DNA の塩基配列に多様性が生じる事がある。

通常、同一の機能を有するポリペプチドをコードするDNA の塩基配列は、動物種や個体が違っても、互いにホモロジーを有していることが多い。従って、前記式13ないし24いずれかに記載の塩基配列中の少なくとも一部とホモロジーのある塩基配列、すなわち、前記式13ないし24のいずれかのに記載の塩基配列に相補的な配列の少なくとも一部とハイブリダイズするDNA は、本発明のDNA がコードするポリペプチドと同一の機能を有するポリペプチドをコードしていると考えられる。ここで「ハイブリダイズする」とは、前記式13ないし24のいずれかに記載の塩基配列に相補的な配列、もしくはその一部をプローブとして、公知の方法（例えば、サムブルック J. (Sambrook J.)等、Molecular Cloning, a Laboratory Manual 2nd ed., 1989 年、Cold Spring Harbor Laboratory, ニューヨーク(New York)、参照）でハイブリダイゼーションを行った場合にハイブリダイズすることをいう。実施例でも、前記式19の塩基配列に相補的な塩基配列の一部をプローブとして、ハイブリダイゼーションを行う方法を示してある。

このように、前記式13ないし24のいずれかに記載の塩基配列に相補的な塩基配列とハイブリダイズするDNA も本発明第3の態様のDNA に含まれる。特に、前記式13、17、21の塩基配列に相補的な塩基配列とハイブリダイズするDNA であって、Fas リガンドをコードするDNA は、本発明第3の態様の好ましい例の1つである。

本発明第3の態様のDNA は、配列表の配列番号27、25、28のいずれかに記載の塩基配列の一部分の塩基配列を有するDNA であってもよい。実施例に示すように配列表の配列番号27、25、28の塩基配列はそれぞれ、Fas リガンドをコードする

塩基配列を含有するDNA として、それぞれヒト、ラット、マウス由来のcDNAライブラリーより得られたcDNAの塩基配列である。配列番号27、25、28に記載の塩基配列は、その配列中に、それぞれ、前記式16、20、24に記載の配列を含有する。

前記配列表の配列番号27、25、28のいずれかに記載の塩基配列の一部とは、いかなる一部分でもよい。例えば、前記式16、20、24の一部であってもよいし、5'末端側、3'末端側のノンコーディング領域の一部であってもよい。また、その長さは特に限定されない。

当該DNA は、アポトーシスを誘導するポリペプチドをコードするDNA をクローニングするためのプローブや、PCR 用のプライマーとして使用することができる。

また、当該DNA を、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP0) 等の酵素や放射性同位体、蛍光物質、化学発光物質等で標識し、組織や細胞における本発明第1または第2の態様の新規ポリペプチドを検出したり、その発現量を測定する診断用DNA プローブとしても使用することができる。

本発明の第3の態様の新規DNA は、いかなる方法で得られたDNA であってもよい。すなわち、前記式13ないし24（配列表の配列番号13ないし24）、もしくは配列表の配列番号25、27および28を参考にして化学合成されたものであってもよく、適当なDNA ライブラリーからクローニングされたものであってもよい。

本発明の新規DNA を化学合成するには、たとえば、次のように行えばよい。すなわち、まず、前記式13ないし24、もしくは配列表の配列番号25、27および28を参考にして、所望の塩基配列を有するDNA を約20塩基程度からなる断片に分けて

DNA 化学合成機（例えば、394 型、パーキンエルマージャパン（株）製）を用いて合成し、その後、必要に応じて5'末端のリン酸化を行い、各断片をアニーリングし、ライゲーションして目的とするDNAを得る。

本発明の新規DNAをDNAライブラリーから得る例としては、適当なゲノムDNAライブラリーやcDNAライブラリーを、ハイブリダイゼーションによるスクリーニング法や、抗体を用いたイムノスクリーニング法等でスクリーニングし、目的のDNAを有するクローンを増殖させ、そこから制限酵素等を用いて切り出す方法がある。

ハイブリダイゼーション法によるスクリーニングは、前記式13ないし24、もしくは配列表の配列番号25、27および28のいずれかの塩基配列もしくはその一部を有するDNAを ^{32}P 等でラベルしてプローブとし、任意のcDNAライブラリーに対して、公知の方法で（例えば、マニアティス T. (Maniatis T.)等, Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring harbor Laboratory, ニューヨーク(New York), 1982年）行うことができる。

イムノスクリーニング法で用いる抗体は、後述する本発明第9の態様の抗体を使用することができる。

本発明の新規DNAはまた、ゲノムDNAライブラリーもしくはcDNAライブラリーを鋳型とするPCR (Polymerase Chain Reaction)によっても得る事ができる。

PCRは、前記式13ないし24、もしくは配列表の配列番号25、27および28いずれかの配列をもとに、センスプライマー、アンチセンスプライマーを作成し、任意のDNAライブラリーに対し、公知の方法（例えば、ミカエル A. I. (Michael A. I.)等, PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications, アカデミック

出版(Academic Press)、1990年参照)等を行って、本発明の新規DNAを得る事もできる。

上記各種方法で使用するDNAライブラリーは、本発明のDNAを有するDNAライブラリーを選択して使用する。当該DNAライブラリーは、本発明のDNAを有するライブラリーであれば、いかなるものも使用可能であり、市販のDNAライブラリーを使用したり、本発明のDNAを有する細胞からcDNAライブラリーを作成するのに適した細胞を選び公知の方法(サムブルック J. (Sambrook J.) 等、Molecular Cloning, a Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, ニューヨーク(New York), 1989年参照)に従って、cDNAライブラリーを作製し、利用することができる。

DNAの塩基配列が提供されれば、RNAの配列や、相補的なDNAおよびRNAの配列が一義的に決定されるので、本発明の開示により、本発明の第3の態様のDNAに対応するRNAや、本発明の第3の態様のDNAと相補的な配列を有するDNAおよびRNAもまた提供される。

本発明の第3の態様のDNAは、1本鎖であっても、それに相補的な配列を有するDNAやRNAと結合して2重鎖、3重鎖を形成していても良い。

また、当該DNAは、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP0)等の酵素や放射性同位体、蛍光物質、化学発光物質等で標識されていてもよい。

本発明の新規DNAは、本発明第1または第2の態様の新規ポリペプチドを大量に生産するために使用することができる。当該DNAを使用して本発明の新規ポリペプチドを生産させる方法の例は、本発明第7の態様で説明する。当該DNAはまた、上述のように酵素等で標識して、組織における本発明第1および第2の態様

の新規ポリペプチドの発現状況を検査するために使用することができる。すなわち、当該DNA をプローブとして使用して細胞における本発明の第1または第2の態様の新規ポリペプチドの発現量を、mRNA発現量を指標として確認することにより、本発明第1または第2の態様の新規ポリペプチドの製造に適した細胞や細胞の培養条件を決定することができるほか、本発明第1または第2の態様の新規ポリペプチドが関連する疾患の診断を行うことも可能である。

また、本発明の新規DNA を生体内の細胞に導入し、例えば、自己免疫疾患等の遺伝的にアポトーシスの機構が欠損している疾患の遺伝子治療にも使用する事ができる。

さらに、本発明のDNA が有する塩基配列をもとにアンチセンス医薬品を開発し、生体内におけるFas リガンド発現を調節することもできる。すなわち、前記式13ないし24、もしくは配列表の配列番号25、27および28に記載の塩基配列を有する本発明のDNA の一部や、その誘導体を公知の方法で合成し、それらを使用してFas リガンドの発現を調節したり、本発明のDNA に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチドやその誘導体を使用して、Fas リガンドの発現を調節することが可能である。アンチセンス医薬品の技術については、本発明の第10の態様の説明で詳述する。

次に、本発明の第4の態様の組換えDNA 分子について説明する。

本発明の第4の態様の組換えDNA 分子は、上述した本発明の第3の態様の新規DNA を含むことを特徴とする組換えDNA 分子である。本発明の組み換えDNA 分子は、環状、直鎖状等いかなる形態のものであってもよい。また、本発明の組換えDNA 分子は、いかなる用途に使用されるものであってもよい。例えば、本発明の

第1または第2の態様の新規ポリペプチドを産生させる際に用いるものであってもよいし、本発明の第3の態様のDNAを増幅させ大量に得るために用いるものであってもよい。

本発明の第4の態様の組換えDNA分子は、本発明の第3の態様の新規DNAに加え、必要ならば他の塩基配列を有していてもよい。他の塩基配列とは、エンハンサーの配列、プロモーターの配列、リボゾーム結合配列、コピー数の増幅を目的として使用される塩基配列、シグナルペプチドをコードする塩基配列、他のポリペプチドをコードする塩基配列、ポリA付加配列、スプライシング配列、複製開始点、選択マーカーとなる遺伝子の塩基配列等のことである。これらの塩基配列の必要性は、組換えDNA分子の使用目的によって決定されるが、本発明の組換えDNA分子は、本発明第3の態様のDNAに加えて、少なくとも、複製開始点およびマーカー遺伝子を有していることが好ましい。マーカー遺伝子としては、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子等があげられる。

当該組換えDNA分子の好ましい例は、本発明第1または第2の態様の新規ポリペプチドを発現するように大腸菌を形質転換させうるものである。すなわち、当該組換えDNA分子の好適な例は、本発明第3の態様のDNAに加え少なくとも、大腸菌複製開始点、マーカー遺伝子に加えて大腸菌内で機能するプロモーター配列を有していることが好ましい。また、これらに加え、少なくともシグナルペプチドをコードする配列を有していることが好ましい。大腸菌で機能するプロモーター配列の好適な例はtrpプロモーター、lacプロモーターであり、大腸菌で機能しうるシグナルペプチドの好適な例は、大腸菌アルカリフォスファター

ゼのシグナルペプチドである。

また、当該組換えDNA 分子は、本発明第 1 または第 2 の態様の新規ポリペプチドを発現するように酵母や昆虫細胞、動物細胞等の真核細胞を形質転換させうるものであってもよい。

すなわち、当該組換えDNA 分子は、少なくとも、本発明第 3 の態様のDNA 、マーカー遺伝子に加えて、ポリ A 付加配列を有していることが好ましい。これらに加えて、少なくとも、酵母で機能するアルコールオキシダーゼ (AOX) 1 のプロモーター、もしくは昆虫細胞で機能するポリヘドリンプロモーター、もしくは動物細胞で機能するSV40のプロモーターやSR α のプロモーター、ヒトエロンゲーションファクター 1 α (FE1 α) のプロモーター、もしくは大腸菌での複製開始点を有するものも当該組換えDNA 分子の好適な例として挙げられる。

本発明の第 4 の態様の組換えDNA 分子は、本発明の第 3 の態様の新規DNA を任意のベクターに導入して得ることができる。必要であれば、当該新規DNA を他の塩基配列とともに任意のベクターに導入してもよい。また、当該組換えDNA 分子は、本発明第 3 の態様の新規DNA を任意の配列を有するDNA 断片とライゲーションさせることにより得ることができる。DNA をベクターに導入する方法は公知である (サンプブック J. (Sambrook J.) 等、Molecular Cloning, a Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, ニューヨーク (New York), 1989年、参照)。すなわち、DNA とベクターをそれぞれ適当な制限酵素で消化し、得られたそれぞれの断片をDNA リガーゼを用いてライゲーションさせればよい。ベクターは、プラスミドベクター、ファージベクター、ウイルスベクター等いかなるものでもよい。たとえば、pUC118、pBR322、pSV2-dhfr、pBluescriptII、

PHIL-S1、 λ ZapII、 λ gt10、pAc700、YRP17、pEF-BOS、pEFN-II 等から適宜選択して使用することができる。

次に、本発明の第5の態様の形質転換体について説明する。

本発明の第5の態様の形質転換体は、本発明の第3の態様の新規DNA で形質転換されたことを特徴とする。すなわち、本発明第5の態様の形質転換体は、宿主となる適当な細胞や微生物に、本発明第3の態様の新規DNA を直接導入する事によって形質転換されたことを特徴とする。

本発明の第3の態様の新規DNA を宿主細胞に導入する方法としては、エレクトロポレーション法、プロトプラスト法、アルカリ金属法、リン酸カルシウム沈澱法、DEAEデキストラン法、マイクロインジェクション法、ウイルス粒子を用いる方法等の公知方法（実験医学臨時増刊、遺伝子工学ハンドブック1991年3月20日発行、羊土社、参照）があるがいずれの方法を用いても構わない。

本発明の形質転換体は、本発明の第3の態様のDNA 分子を大量に製造する目的でも使用することができる。また、本発明の第3の態様のDNA が、宿主細胞の適当なプロモーターの下流に組み込まれた場合には、当該形質転換体は、本発明第1または第2の態様の新規ポリペプチドを生産する。従って、このような形質転換体は、本発明の第1または第2の態様のポリペプチドを製造する目的等に使用できる。

次に、本発明の第6の態様の形質転換体について説明する。

本発明第6の態様の形質転換体は、本発明の第4の態様の組換えDNA 分子を宿主となる細胞や微生物に導入する事によって、形質転換されたことを特徴とする。ただし、該組換えDNA 分子の作成に使用するベクターは、宿主細胞に適し

た種類のものである必要がある。同様に、組換えDNA 分子内に含まれるプロモーター、シグナルペプチドをコードする塩基配列、マーカー遺伝子等は、宿主細胞に適したものである必要がある。例えば、組換えDNA 分子の作製に使用したベクターと宿主の好ましい組み合わせの例としては、pUC118と大腸菌、pEF-BOSとCOS 細胞あるいはCHO 細胞、Yac と酵母、AcNPV とSf細胞等（実験医学臨時増刊、遺伝子工学ハンドブック1991年 3月20日発行、羊土社、参照）が挙げられる。

本発明の第4の態様の組換えDNA 分子を宿主細胞に導入する方法としては、上記第5の態様の形質転換体の作成方法と同様に、エレクトロポレーション法、プロトプラスト法、アルカリ金属法、リン酸カルシウム沈澱法、DEAEデキストラン法、マイクロインジェクション法、ウイルス粒子を用いてインフェクションさせる方法、その他の公知方法（実験医学臨時増刊、遺伝子工学ハンドブック1991年 3月20日発行、羊土社、参照）が挙げられる。

本発明第6の態様の形質転換体は、原核細胞、真核細胞のいずれであってもよい。原核細胞の代表的な例としては、大腸菌と枯草菌があげられる。真核細胞の代表的な例としてはCHO 細胞、HeLa細胞、COS 細胞、Namalwa 細胞等の哺乳動物細胞の他、Sf細胞等の昆虫細胞や酵母等があげられる。

しかしながら、本発明の形質転換体は、好ましくは、大腸菌もしくは哺乳動物細胞もしくは酵母を形質転換させたものである。動物細胞の中では、遺伝子のコピー数を増加させることが可能な、CHO 細胞のdhfr欠損株が好ましい。また、酵母については、外来蛋白質の分泌発現量が多いという点で、ピキア(Pichia)属の酵母が好ましい。

本発明第 6 の態様の形質転換体は、本発明第 3 の態様の新規 DNA を大量に得る目的や、本発明第 1 または第 2 の態様の新規ポリペプチドを生産するために使用することができる。

当該形質転換体は、いかなる目的で使用されるものであってもよいが、好ましくは、当該形質転換体は、本発明の新規ポリペプチドを産生するものがよく、より好ましくは、本発明の新規ポリペプチドを培地中に分泌するものがよい。

本発明の第 1 または第 2 の態様の新規ポリペプチドを生産する形質転換体を得るためには、宿主細胞に導入する本発明の第 4 の態様の組換え DNA 分子中には、少なくとも、その宿主細胞で機能しうるプロモーター配列が含まれていることが必要である。そして、宿主細胞が大腸菌等の原核細胞である場合には、組換え DNA 分子にはプロモーター配列に加え、複製開始点が含まれている必要がある。また、宿主細胞が動物細胞等の真核細胞である場合には、組換え DNA 分子中には、プロモーター配列に加え、ポリ A 付加サイト、複製開始点が含まれていることが必要である。なお、いずれの場合にも使用する組換え DNA 分子には上述したマーカー遺伝子が含まれていることが好ましい。

また、当該形質転換体が発明の第 1 または第 2 の態様の新規ポリペプチドを発現し分泌するためには、形質転換に使用する組換え DNA 分子中には、上記の産生に必要な配列に加えて、本発明の第 3 の態様の DNA の 5' 末端に、シグナルペプチドをコードする塩基配列を有していることが好ましい。

本発明の形質転換体のより好ましい例の一つは、少なくとも、複製開始点、大腸菌で機能するプロモーター、マーカー遺伝子、大腸菌アルカリフォスファターゼ等のシグナルペプチドをコードする塩基配列、及び本発明第 3 の態様の新

規DNA を含む組換えDNA 分子で形質転換された大腸菌である。他の好ましい例は、少なくとも、マーカー遺伝子、ポリ A 付加配列、哺乳動物細胞で機能するプロモーター、および本発明第 3 の態様の DNA を含む組換え DNA 分子で形質転換された哺乳動物細胞である。また、少なくとも、AOX1 のプロモーター、マーカー遺伝子、及び本発明の第 3 の態様の DNA を含む組換え DNA 分子で形質転換されたピキア(Pichia)属の酵母も本発明の形質転換体の好ましい例である。

本発明第 7 の態様の製造方法は、本発明第 5 または第 6 の態様の形質転換体を使用することを特徴とする本発明第 1 または第 2 の態様の新規ポリペプチドの製造方法である。形質転換体の作製方法については既に説明した通りである。

当該製造方法では、まず、本発明第 5 または第 6 の態様の形質転換体を培養し、必要に応じて、遺伝子の増幅や発現誘導を行う。次に、培養混合物を回収し、それらを材料として、必要に応じて濃縮、可溶化、透析、各種クロマトグラフィー等の操作を行い、本発明の第 1 または第 2 の態様の新規ポリペプチドを精製する。

当該製造方法で使用する形質転換体は、いかなる宿主を形質転換したものであってもよい。しかしながら、好ましくは、CHO 細胞等の哺乳動物細胞もしくは酵母、もしくは大腸菌のいずれかより選択される細胞を宿主とした形質転換体であることが好ましい。

形質転換体の培養は、一般的な方法で行うことができる。形質転換体の培養については各種の成書（たとえば、「微生物実験法」社団法人日本生化学会編、株式会社東京化学同人、1992年、参照）があるので、それらを参考にして行うことができる。また、遺伝子の増幅や発現誘導の方法および必要性は、宿主となる細

胞の種類や、使用するプロモーターによって異なる。例えば、プロモーターがtrp プロモーターである時には3- β -インドールアクリル酸で、MMTVプロモーターである場合にはデキサメサゾンで、AOX1プロモーターであればメタノールで誘導することが可能である。

一方、遺伝子の増幅方法の例としては、宿主としてdhfr欠損のCHO 細胞、ベクターとしてdhfrを有するベクターを使用した際のメソトレキセートを使用した遺伝子の増幅方法がある。

以下に、形質転換体として大腸菌、CHO 細胞、ピキア (Pichia) 属酵母を使用した場合の培養および発現誘導の例を示す。

trp プロモーターを有する組換えDNA 分子で形質転換された大腸菌では、L-ブロース (L-Broth) で菌体を前培養し、それをM9-CA の培地に対して1/50量となるように植え込み、37°Cで培養を行う。培養開始数時間後に培地のOD₅₅₀ 値が1~4 (すなわち対数増殖期) に達した時点で3- β -インドールアクリル酸を終濃度10 μ g/mlとなるように添加し発現誘導を行う。さらに約1~2日の培養を行うことにより、目的ポリペプチドを含む培養混合物を得ることができる。

AOX1プロモーターを有する組換えDNA 分子で形質転換されたピキア(Pichia)属の酵母を用いる場合には、BMGY培地で約2日間前培養し、培地交換後、メタノールを加えて発現誘導する。さらに、30°Cで約2日間の培養を行い、目的ポリペプチドを含む培養混合物を得ることができる。

一方、エロンゲーションファクターのプロモーターを有する発現プラスミドが導入されたCHO 細胞等の哺乳動物細胞の形質転換体では、10%ウシ胎児血清を含有するD-MEM (Dulbecco modified eagle's medium) で培養する。細胞は、約5

$\times 10^4$ 細胞/mlの濃度で植え込み、37°C、5 %炭酸ガス/95 %空気の条件で培養を行う。通常、2～3日後にコンフルエントな状態になるので、その時点で培地を、血清不含のD-MEM に交換する。さらに引き続き、2～3日間の培養を行うことにより目的ポリペプチドを含む培養混合物を得ることができる。なお、目的ポリペプチドの産生量が少ない場合には前述したようにdhfr遺伝子欠損CHO 細胞を使用し、メソトレキセートにより遺伝子を増幅し、産生量を増加させることも可能である。

本発明第7の態様において、培養混合物とは、培養上清もしくは細胞のことである。すなわち、形質転換体が、当該ポリペプチドを細胞外に分泌する場合にはその培養上清を材料として、本発明の第1または第2の態様の新規ポリペプチドを回収、精製する。

一方、当該新規蛋白質が宿主細胞内に蓄積される場合には、リゾチーム、界面活性剤、凍結融解、加圧等の手段を用いて細胞を破砕した後、遠心分離して上清を回収し、濾過等により不要な細胞断片等を取り除いた後に、それを材料として本発明第1または第2の態様の新規ポリペプチドを精製する。使用する形質転換体が大腸菌であり、産生された当該新規ポリペプチドがペリプラズムに蓄積される場合は、ウィルスキー(Willsky)等の方法(J. Bacteriol., 127巻、595-609頁、1976年)等が使用できる。

培養混合物から本発明第1または第2の態様の新規ポリペプチドを精製する方法としては、ポリペプチドの精製に通常使用されている方法の中から適切な方法を適宜選択して行うことができる。すなわち、塩析法、限外濾過法、等電点沈澱法、ゲル濾過法、電気泳動法、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマト

グラフィーや抗体クロマトグラフィー等の各種アフィニティークロマトグラフィー、クロマトフォーカシング法、吸着クロマトグラフィーおよび逆相クロマトグラフィー等、通常使用され得る方法の中から適切な方法を適宜選択し、必要によりHPLCシステム等を使用して適当な順序で精製を行えば良い。精製方法の好適な例を、本発明第8の態様として提供する。

当該製造方法において、本発明第1または第2の態様の新規ポリペプチドは、他のポリペプチドとの融合ポリペプチドとして形質転換体に生産させてもよい。たとえば、大腸菌の β -ガラクトシダーゼをコードするDNAの下流に目的のポリペプチドをコードするDNAを接続し、目的のポリペプチドを β -ガラクトシダーゼとの融合ポリペプチドとして発現させる方法は、高い生産量が期待できることから一般に行われている方法である。

当該ポリペプチドを他のポリペプチドとの融合ポリペプチドとして発現させた場合には、精製工程のいずれかのステップにおいて、融合ポリペプチドをブロムシアン等の化学物質やプロテアーゼ等の酵素で処理して当該ポリペプチドを切り出す操作が必要になる。

また、使用する形質転換体が大腸菌であった場合に、当該ポリペプチドを不溶化蛋白であるインクルージョンボディーとして産生させた場合には、精製の際に、インクルージョンボディーを可溶化し、デネイチャーし、リフォールディングするという操作を精製の適当なステップで行えばよい(トマス E. 及びクライトン J. (Thomas E. and Creighton J.), Molecular Biology, 87巻, 563-577 頁, 1974年等参照)。

具体的には、まず、菌体を破碎し、遠心分離してペレットを回収する。次に、

尿素もしくはグアニジン塩酸、界面活性剤、還元型グルタチオン、酸化型グルタチオンを適量含む可溶化バッファー（たとえば、5Mグアニジン塩酸、0.005 % Tween80、50mM トリス塩酸(pH8.0)、5mM EDTA、2mM 還元型グルタチオン、0.02 mM酸化型グルタチオンを含む緩衝液）をペレットに加え、2-メルカプトエタノールを加えてデネイチャーし、上記可溶化バッファーからグアニジン塩酸を取り除いた溶液に対して透析してリフォールディングする。目的のポリペプチドを融合蛋白質として発現させている場合には、これらの操作の後で、ブロムシアンの化学物質もしくはプロテアーゼ等の酵素で不要な部分を切断し、その後、適当なクロマトグラフィーを行う。

次に、本発明の第8の態様の精製方法を説明する。

本発明の第8の態様は、本発明第1または第2の態様の新規ポリペプチドを含む試料中から本発明第1または第2の態様の新規ポリペプチドを精製する方法であって、少なくとも下記より選ばれるいずれか1つ以上の工程を行う事の特徴とする。

(1) Fas 抗原を使用したアフィニティークロマトグラフィー

(2) 本発明第1または第2の態様の新規ポリペプチドを認識する抗体を使用したアフィニティークロマトグラフィー

当該精製方法は、上記(1)もしくは(2)のいずれかのみを行うものであってもよく、(1)および(2)の両方を行うものであってもよい。また、他の精製方法と上記(1)もしくは(2)の少なくとも1つを組合わせて行うものであってもよい。しかしながら、好ましくは、蛋白質の精製方法として通常行われている方法の前もしくは後に、上記(1)もしくは(2)のいずれか一方、も

しくは両方の工程を任意の順序で行うものである。

例えば、上記（１）もしくは（２）の工程のいずれかに加え、レクチンを吸着させた担体を使用したクロマトグラフィーを行うことにより、本発明第１または第２の態様のポリペプチドを高純度で得ることができる。

本発明第１または第２の態様の新規ポリペプチドを含有する試料とは、当該新規蛋白質を含有するものであれば、いかなるものであってもよい。例えば、細胞の培養上清であっても、細胞のライセートであってもよく、尿や血液等の体液であってもよい。

上記（１）のアフィニティークロマトグラフィーを行うためには、Fas 抗原蛋白質を適当な担体に吸着させる事が必要である。使用するFas 抗原は本発明第１または第２の態様のポリペプチドと結合するものであればいかなる動物由来の物であってもよい。しかしながら、精製しようとする目的のポリペプチドが、前記式１ないし４のいずれかのアミノ酸配列またはそれらの一部を有する場合にはヒトFas 抗原を、前記式５ないし８のいずれかのアミノ酸配列またはそれらの一部を有するものである場合にはラットFas 抗原もしくはマウスFas 抗原を、前記式９ないし１２のいずれかのアミノ酸配列またはそれらの一部を有するものである場合にはマウスFas 抗原を、それぞれ使用する事が好ましい。

Fas 抗原を吸着させる担体の種類は特に限定されない。Fas 抗原を担体に結合させる場合には、Fas 抗原を直接担体に結合させるか、スペーサーを介して結合させる。また、Fas 抗原を他のポリペプチドとの融合ポリペプチドとして作製し、融合ポリペプチド中のFas 抗原以外の部分をそれと結合可能な担体に結合させ、間接的に、Fas 抗原を担体に結合させてもよい。例えば、Fas 抗原と免疫

グロブリンの定常領域との融合ポリペプチドであれば、免疫グロブリンとプロテインAが吸着する性質を利用して、プロテインAが吸着したカラムに該融合ポリペプチドを吸着させ、結果としてFas 抗原吸着担体を容易に得る事が可能になる。

また、上記（２）のアフィニティークロマトグラフィーを行うためには、本発明第９の態様の新規抗体を使用することができる。すなわち当該新規抗体をアガロース等の適当な担体に直接、もしくはスペーサーを介して結合させ、これを、アフィニティークロマトグラフィー用カラムとして使用する。なお、上述したレクチンを吸着させた担体の好ましいものとしては、ConAを吸着させた担体があげられる。例えば、ConAをアガロース担体に吸着させたものなどが市販されているのでそれらを適宜選択し使用することが簡便である。

上記（１）および（２）のアフィニティークロマトグラフィー及び、レクチンを吸着させた担体を使用するアフィニティークロマトグラフィーは、ポリペプチドの精製に使用される溶液を適宜選択して溶出液とし、溶出された各画分の活性もしくは各画分中の本発明の第１または第２の態様の新規ポリペプチドの存在を確認しながら行えばよい。本発明第１または第２の態様の新規ポリペプチドの存在を確認するには、各画分のFas 抗原を発現する細胞に対する細胞障害活性を測定したり、本発明の第１または第２の態様のポリペプチドを認識する抗体を使用したEIA 等で確認することができる。本発明の第１または第２の態様のポリペプチドを認識する抗体については本発明第９の態様で説明する。

次に、本発明の第９の態様の新規抗体について説明する。

本発明の第９の態様の新規抗体は、本発明の第１または第２の態様の新規ポリ

ペプチドに結合することを特徴とする。

本発明の第 9 の態様の新規抗体は、本発明の第 1 または第 2 の態様の新規ポリペプチドと結合する限り、モノクローナル抗体であっても、ポリクローナル抗体であってもよい。

抗体、すなわち、免疫グロブリンの構造はH鎖とL鎖とからなり、物理化学的性質や免疫学的性質は、5つのクラス(IgG, IgA, IgM, IgD, IgE)に分けられる。このうち、IgG、IgAはさらにH鎖のタイプによって、サブクラスに分けられる。本発明の新規抗体は、これらのいずれのクラス、サブクラスに属するものであってもよい。

さらに、免疫グロブリンは例えばペプシンで分解すると、F(ab')₂とFc'に別れ、パパインで分解するとFabとFcの2つのフラグメントに分かれる。本発明の抗体は、抗原と結合するものであれば、完全な抗体分子でもその一部のフラグメントでもよい。また、本発明の抗体はキメラ抗体であってもよい。

本発明の新規抗体は、それがポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であっても、公知方法を参考にして得ることができる(例えば、免疫実験操作法、日本免疫学会編、日本免疫学会発行、参照)。以下に簡単に説明する。

当該新規抗体を得るには、まず動物に、免疫抗原として本発明の第 1 または第 2 の態様の新規ポリペプチドを必要に応じてフロイントの完全アジュバント(FCA)や不完全アジュバント(FIA)等の適切なアジュバントとともに接種し、必要があれば2～4週間の間隔で追加免疫する。追加免疫後、採血を行い抗血清を得る。抗原として用いる本発明の新規ポリペプチドは、それが抗体の作製に使用しうる精製度のものであればいかなる方法で得られたものであってもよ

い。

免疫抗原として使用するポリペプチドが、低分子のポリペプチド、すなわち約10～20アミノ酸からなるポリペプチドである場合には、それをキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）等のキャリアと結合させて抗原として使用すればよい。当該新規ポリペプチドで免疫する動物はいかなるものであっても良いが、好ましくは通常当業者で免疫学的な実験に使用されるラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ウマ、ニワトリ、ヤギ、ブタ、ウシ等から、目的の抗体を産生しうる動物種を選択して使用することが好ましい。

ポリクローナル抗体は、得られた抗血清を精製することによって得る事が出来る。精製は、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の公知方法を適宜組み合わせて行えば良い。

モノクローナル抗体を得るには以下のように行う。すなわち、免疫した動物から脾細胞もしくはリンパ球等の抗体産生細胞を採取し、ポリエチレングリコール、センダイウイルス、電気パルス等を用いる公知方法によって、ミエローマ細胞株等と融合し、ハイブリドーマを作製する。その後、本発明の第1または第2の態様の新規ポリペプチドに結合する抗体を産生しているクローンを選択して培養し、その選択されたクローンの培養上清を精製することによって得れば良い。精製は、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の公知方法を適宜組み合わせて用いれば良い。

また、遺伝子工学的な方法を用いても当該新規抗体が得られる。例えば、本発明第1または第2の態様の新規ポリペプチドで免疫した動物の脾細胞、リンパ球あるいは、本発明第1または第2の態様の新規ポリペプチドに対するモノクロー

ナル抗体を産生するハイブリドーマからmRNAを採取し、これをもとにcDNAライブラリーを作成する。抗原と反応する抗体を産生しているクローンをスクリーニングし、得られたクローンを培養し、培養混合物から目的とする抗体を公知方法を組み合わせて精製することができる。

本発明の新規抗体は、体液中や組織中に存在する本発明の新規ポリペプチドを検出するために使用することができる。また、本発明の新規ポリペプチドを精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明の新規ポリペプチドを検出するために使用することができる。

本発明の新規抗体は、細胞に対するFas リガンドの作用を修飾するものであってもよい。細胞に対するFas リガンドの作用を修飾する抗体の中で、特に好ましくは、Fas リガンドが誘導するアポトーシスを抑制する効果を有するものである。当該抗体は、Fas リガンドが誘導するアポトーシスを完全に抑制するものであってもよく、また、部分的に抑制するものであっても良い。

Fas リガンドが誘導するアポトーシスを抑制する効果を有する抗体を得るには、前記ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を製造する過程で得られる血清や、ハイブリドーマの培養上清を、例えば、次のようなアッセイ系にかけてスクリーニングする。すなわち、Fas リガンドもしくはFas リガンドを発現する細胞と、Fas 抗原を発現する細胞とを使用したin vitroのアッセイ系等である。スクリーニングの結果、選別された血清や培養上清から公知方法を組み合わせて目的の抗体を精製する。なお、Fas リガンドもしくはFas リガンドを発現する細胞とFas 抗原を発現する細胞を利用したスクリーニング方法の好ましい例は、本発明第11の態様で説明する。

Fas リガンドが誘導するアポトーシスを、完全に、又は、部分的に抑制することができる抗体は、生体におけるアポトーシスを調節するために使用することができる。たとえば、当該抗体はリウマチにおける関節組織の破壊、全身性エリテマトーデス（SLE）における自己組織の破壊、あるいは糖尿病、インフルエンザ、エイズ、肝炎等の組織や細胞のアポトーシスが関与する疾患の治療薬として使用することができる。

次に本発明第10の態様を説明する。

本発明第10の態様は、Fas リガンド遺伝子の一部もしくはFas リガンドに対するmRNAの一部に相補的な塩基配列を含むことを特徴とするオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体である。当該オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド誘導体には、その塩基配列として、前記相補的な塩基配列のみを有する物、前記相補的な塩基配列に加えて、リボザイム配列等、他の塩基や塩基配列を有する物のいずれもが含まれる。

ここで、「Fas リガンド遺伝子」とは、Fas リガンドをコードするDNA を含む遺伝子のことであり、Fas リガンドをコードする領域に加え、その制御領域を含むものである。制御領域は、Fas リガンドをコードする領域の上流に存在するもの、下流に存在するものいずれをも意味する。「Fas リガンドに対するmRNA」とは、Fas リガンドをコードする塩基配列を含むmRNAである。当該mRNAには、Fas リガンドをコードする塩基配列に加え、その上流および下流のノンコーディング領域を含むものも含まれる。

Fas リガンドをコードする染色体DNA は、図16～18に示したように、イントロン部位とエクソン部位とからなることがわかっている。イントロンとエクソンか

らなるDNA がmRNAに転写される際には、まず、イントロンとエクソンとがそのまま転写されてpre-mRNAとなり、その後スプライシングを受けて、イントロンに対応する部分が削除され、エクソン部分のみが転写された成熟mRNAとなる。ここでいう「Fas リガンドに対するmRNA」には、pre-mRNA、成熟mRNAのいずれもが含まれる。

また、「Fas リガンド遺伝子の一部もしくはFas リガンドに対するmRNAの一部」とは、それらがコーディング領域であるか否かに関わらず、また、イントロン部位、エクソン部位に関わらず、Fas リガンド遺伝子もしくはFas リガンドに対するmRNAに含まれるいかなる部分をも意味する。

なお、本発明の第10の態様において「Fas リガンド」はいかなる動物種由来のFas リガンドであってもよいが、好ましくは、ヒト、ラット、マウスいずれかに由来するFas リガンドである。診断薬や医薬品への応用を考えると、特に好ましくは、ヒトFas リガンドである。ヒトFas リガンド遺伝子のコーディング領域付近の塩基配列は図16～18に示してある。また、ヒトFas リガンド、ラットFas リガンド、マウスFas リガンドをコードするDNA の塩基配列はそれぞれ配列番号31、25、28に示してある。上記各Fas リガンドに対する各成熟mRNAを含む塩基配列は、配列番号31、25、28に示された塩基配列中のTをUに読み変えることによって得ることができる。

「相補的な塩基配列」とは、DNA やmRNAの塩基配列に対して塩基特異的に相補的塩基対を形成するような塩基配列をいう。一般的には、C（シトシン）とG（グアニン）の間、T（チミン）とA（アデニン）の間、およびU（ウラシル）とA（アデニン）との間で相補的塩基対が形成されることが知られて

いる。したがって、ヒトFas リガンド遺伝子に相補的な塩基配列、およびヒトFas リガンド、ラットFas リガンド、マウスFas リガンドに対する各成熟mRNAに相補的な塩基配列を含む配列は、それぞれ、図16～18、配列番号31、25、28に示した塩基配列中のAに対してT、Cに対してG、Gに対してC、Tに対してAを対応させた配列、もしくはAに対してU、Cに対してG、Gに対してC、Tに対してAを対応させた配列である。配列表の配列番号31の塩基配列に相補的なDNA およびRNA の配列は、それぞれ配列番号29、30に5' → 3' 方向で示してある。なお、「相補的な塩基配列」にはC、G、A、T、Uからなる塩基配列のみならず、これら塩基の誘導体を含む配列であってもよい。

本発明のオリゴヌクレオチドには、塩基、リン酸、糖からなるヌクレオチドが複数結合したもの全てが含まれる。その代表的な物はDNA とmRNAである。

本発明のオリゴヌクレオチド誘導体には、その立体構造や機能がオリゴヌクレオチドと類似するものすべてが含まれる。たとえば、オリゴヌクレオチドの3' 末端もしくは5' 末端に他の物質が結合した物や、オリゴヌクレオチドの塩基、糖、リン酸の少なくともいずれか1つにおいて、置換や、修飾が生じた物質、天然には存在しないような、塩基、糖、リン酸を有する物や、糖-リン酸骨格以外の骨格（バックボーン）を有するもの等である。

本発明第10の態様のオリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド誘導体は、Fas リガンド遺伝子の一部もしくはFas リガンドに対するmRNAの一部に相補的な塩基配列を有し、これらの遺伝子やmRNAにハイブリダイズするものが好ましい。特に好ましくは、少なくともヒトFas リガンド遺伝子もしくはヒトFas リガンドに対するmRNAにハイブリダイズするものである。

Fas リガンド遺伝子もしくはFas リガンドに対するmRNAにハイブリダイズするようなオリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド誘導体は、組織や細胞におけるFas リガンド遺伝子の存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することができる。さらに、これらのオリゴヌクレオチドおよびその誘導体は、Fas リガンド遺伝子もしくはmRNAにハイブリダイズして、Fas リガンドの発現を促進もしくは抑制することが期待されるので、Fas リガンドの発現を調節し、Fas リガンドによって誘導されるアポトーシスが関与する疾患の治療薬として使用することができる。

本発明のオリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド誘導体は、Fas リガンド遺伝子もしくはFas リガンドに対するmRNAにハイブリダイズし、Fas リガンドの発現を調節する活性を有するものが好ましく、特に好ましくは、Fas リガンドの発現を抑制するものである。すでに述べたように、エイズや肝炎における細胞死はFas 抗原を介したアポトーシスであると考えられている。したがって、Fas リガンドの発現を抑制するオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体は、エイズ、肝炎をはじめ、リウマチにおける関節組織の破壊、全身性エリテマトーデス（SLE）における自己組織の破壊、糖尿病、インフルエンザ等のFas リガンドを介したアポトーシスが関与する疾患の治療薬として使用することができる。

一方、Fas リガンドの発現を促進するものは、エイズ感染初期の治療や、リウマチにおける滑膜細胞の異常増殖や自己免疫疾患における自己抗原反応性T細胞の増殖を抑制するため等、生体にとって不要な細胞を除去するために使用できる。

蛋白質をコードするDNA やmRNAに相補的な塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを使用して、その蛋白質の発現を調節する方法は、アンチセンス法と呼ばれており、現在多くの研究者によって研究が進められている技術である。相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドは、①遺伝子からpre-mRNAへの転写段階、②pre-mRNAから成熟mRNAへのプロセッシング段階、③核膜通過段階、④蛋白への翻訳段階のいずれかで、遺伝子情報を担うDNA もしくはmRNAに結合し、遺伝情報の伝達の正常な流れに影響を与えて蛋白質の発現を調節すると考えられている。

本発明のオリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド誘導体は、Fas リガンド遺伝子もしくはFas リガンドに対するmRNAのいかなる部分にハイブリダイズするものであってもよい。ハイブリダイズのしやすさの点では、一般的には、ステム・ループを形成しているmRNAのループ部分にハイブリダイズするような塩基配列、すなわち、ステム・ループを形成している領域の塩基配列に相補的な塩基配列をもつオリゴヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチド誘導体を設計するとよいとされている（東海林洋子、臨床免疫、25巻、1200-1206頁、1993年）。

また、翻訳開始コドン付近、リボソーム結合部位、キャッピング部位、スプライス部位に結合するようなオリゴヌクレオチド、すなわち、これらの部位の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドは、一般に高い発現抑制効果が期待できるものと考えられているので（癌と化学療法、20巻、13号、1899-1907頁）、本発明のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体が、Fas リガンド遺伝子もしくはFas リガンドに対するmRNAの翻訳開始コドン付近、リボソーム結合部位、キャッピング部位、スプライス部位に結合するもの、すなわち、これらの部位に相補的な配列を含むものであれば、高い発現抑制効果が期待

される。

本発明のオリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド誘導体は、診断や医薬用途として使用することを考慮すると、Fas リガンド遺伝子もしくはmRNAと、特異的にハイブリダイズするものが好ましい。

一般的には、15塩基以上の塩基を含む塩基配列であれば、特異性のある配列であると考えられている（横山一成、蛋白質 核酸 酵素、38巻、754 ～765 頁、1994年）。したがって、当該オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド誘導体も、Fas リガンド遺伝子もしくはFas リガンドに対するmRNAに相補的な塩基配列であって15塩基以上からなる塩基配列を含むものであれば、Fas リガンド遺伝子もしくはFas リガンドに対するmRNAに特異的に結合することが期待される。

一方、オリゴヌクレオチドを細胞内に取り込ませるには、その長さはあまり長すぎても不適當である。本発明第10の態様のオリゴヌクレオチドおよびその誘導体は、いかなる長さのものであってもよいが、本発明のオリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド誘導体を細胞内に取り込ませ、Fas リガンドの発現を調節させることを考慮すると、当該オリゴヌクレオチドおよびこれらオリゴヌクレオチドの誘導体はFas リガンド遺伝子もしくはFas リガンドに対するmRNAに相補的な15塩基以上30塩基以下、好ましくは15塩基以上25塩基以下、より好ましくは18塩基以上22塩基以下の塩基数からなる塩基配列を有するものが好ましい。

アンチセンス技術の進歩とともに、オリゴヌクレオチドの医薬品としての効果を高めることを目的として様々な誘導体が見いだされてきた。現在、目的のDNAやmRNAとの結合力、組織選択性、細胞透過性、ヌクレアーゼ耐性、細胞内安定性の高い様々なオリゴヌクレオチド誘導体を得られている。

前述のように、本発明の「オリゴヌクレオチド誘導体」には、天然には存在しないような、塩基、糖、リン酸、バックボーン構造からなるものも含めて、あらゆる種類の誘導体が含まれる。

現在一般に知られている誘導体の例としては、バックボーン構造として、その全部または一部にフォスフォジエステル (phosphodiester) 結合、フォスフォロチオエート (phosphorothioate) 結合、フォスフォトリエステル (phosphotriester) 結合、メチルフォスフォネート (methylphosphonate) 結合、フォスフォロアミデート (phosphoroamidate) 結合、フォスフォロジチオエート (phosphorodithioate) 結合、モルホリノ基を有する物等 (東海林 洋子等、癌と化学療法、20巻、1899-1907頁、1993年) があげられる。また、ポリアミド-核酸 (PNA) (P.E. ニールセン (P.E. Nielsen) 等、Science、254 巻、1497-1500頁、1991年) や、糖の 2' 位が、他の原子あるいは置換基に置換されたものや α -リボース等、糖部分を修飾したものも誘導体の例として挙げられる (ミカエル J. ゲート (Michael J. Gait), 290-299頁: in Antisense Research and Applications, CRC 出版、フロリダ、1993年)。

さらに、糖部分が他の物質に置換されたもの、一部の塩基がイノシン (A、T、C、Gのいずれにでも結合するユニバーサル塩基と呼ばれる) に置換された物、オリゴヌクレオチドの 5' 末端もしくは 3' 末端もしくは内部にコレステロールやアクリジン、ポリ-L-リジン、ソラレン (psoralen)、長鎖アルキル等が結合したもの等も、オリゴヌクレオチド誘導体の例として知られている (マコト マツクラ (Makoto Matsukura), 506-519頁およびポール S. ミラー (Paul S. Miller) 等、190-202 頁: in Antisense Research and Applications, CRC 出版、フロリ

ダ、1993年）。

本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、上に例示した誘導体をはじめとしていかなる誘導体であってもよい。しかしながら、当該誘導体は、ヌクレアーゼ耐性、組織選択性、細胞透過性、結合力の少なくとも1つが高められた誘導体であることが好ましい。

特に好ましくは、当該オリゴヌクレオチド誘導体は、フォスフォロチオエート結合をバックボーン構造として有する誘導体である。

以下に、本発明のオリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド誘導体の製造方法を説明する。

オリゴヌクレオチドやその誘導体は、公知方法で製造することができる（例えば、スタンレー T. クルーク(Stanley T. Crooke) およびベルナルド レブロー(Bernald Lebleu)編、in Antisense Research and Applications, CRC 出版、フロリダ、1993年）。

天然のDNA やRNA であれば、化学合成機を使用して合成したり、Pst リガンド遺伝子を鋳型としてPCR 法により本発明のオリゴヌクレオチドを得ることができる。また、メチルフォスフォネート型やフォスフォロチオエート型等、誘導体の中には、化学合成機（たとえばパーキンエルマージャパン（株）製、394 型）を使用して合成できるものもある。この場合には、化学合成機に添付されたマニュアルに従って操作を行い、得られた合成産物を逆相クロマトグラフィー等を用いたHPLC法により精製することによっても、目的のオリゴヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチド誘導体を得ることができる。

次に、本発明のオリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド誘導体の利用方

法について説明する。

本発明のオリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド誘導体を診断用のプローブとして使用する場合には、それらを、公知の方法に従い、ラジオアイソトープや、酵素、蛍光物質、発光物質等で標識する。次に、Fas リガンドの発現を調べたい患者の細胞からDNA もしくはmRNAを公知方法で調製し、これを被検物質として、前記標識プローブを加えて反応させた後、洗浄して未反応の前記標識プローブを除去する。被検物質中に、Fas リガンド遺伝子もしくはRNA が含まれていれば、当該オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体はそれらと結合する。結合形成の有無は、標識した酵素、蛍光物質、発光物質、あるいは放射性同位元素等による発光、蛍光、放射能等を指標として知ることができる。

近年、Fas リガンドの発現と自己免疫疾患の関係等が報告されているので、本発明のオリゴヌクレオチドを使用した診断プローブは、たとえば、リウマチやSLE 等の自己免疫疾患等の診断に利用することができる。また、炎症時のT細胞による細胞障害にもFas リガンドが関係していると考えられるので、炎症の程度や治療方法を決定するための診断にも使用することができる。

本発明のオリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド誘導体を医薬用途に使用する場合には、医薬品として使用するのに適した純度のものを、薬理学的に許容されうる使用方法で使用する事が好ましい。

本発明第10の態様のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体は、それらを直接適当な溶媒に溶解もしくは懸濁して使用してもよいし、リボソーム中に封入したり、適当なベクターに組み込んだ形にして使用してもよい。また、必要に応じて、本発明のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体に

薬理学的に許容され得る補助成分を添加し、注射剤、錠剤、カプセル剤、点眼剤、クリーム剤、座剤、噴霧剤、パップ剤等適当な剤型にして使用してもよい。薬理学的に許容され得る補助成分とは、溶媒、基剤、安定化剤、防腐剤、溶解剤、賦形剤、緩衝剤等のことである。

本発明のオリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド誘導体は、上述のような剤型とした場合、患者の年齢や、性別、疾患の種類、程度に応じて、その投与方法、その投与量を設定して使用することができる。すなわち、アポトーシスを調節し、病態を改善するのに適した量を、経口投与、あるいは、吸入、経皮投与、点眼、腔内投与、関節内投与、直腸投与、静脈内投与、局所投与、筋肉内投与、皮下投与、腹腔内投与等から適当な方法を選んで投与すればよい。

以下に、本発明第11の態様のスクリーニング方法について説明する。

本発明の第11の態様のスクリーニング方法は、本発明第1または第2の態様のポリペプチドまたはそれを発現するように形質転換した形質転換体を使用することを特徴とする。

本発明のスクリーニング方法では、好ましくは、本発明第1または第2の態様のポリペプチド、もしくはそれを発現する形質転換体に加え、Fas 抗原を発現する細胞を使用することが好ましい。この方法を使用すれば、Fas リガンドに結合する物質、Fas リガンドの発現を促進もしくは抑制する物質に加え、Fas 抗原の発現を促進もしくは抑制する物質、Fas リガンドの細胞への作用を調節する物質をスクリーニングすることができる。Fas リガンドの細胞に対する作用の代表的なものはアポトーシスの誘導であるが、当該スクリーニング方法は、アポトーシスを促進したり抑制したりする物質の他にも、Fas リガンド存在下でFas 抗原発

現細胞に生じる何らかの変化を促進したり抑制したりする物質のスクリーニングにも適している。

当該スクリーニング方法は、いかなる工程を含むものであってもよいが、好ましくは、下記（１）ないし（３）より選ばれるいずれかの工程を含むものである。すなわち、

- （１） a. Fas 抗原を発現する細胞を、Fas リガンドもしくはそれを発現する形質転換体、もしくはその培養上清からなる群より選ばれるいずれかとともに培養する。
b. a に被験物質もしくは被験物質を含む試料を添加する。
c. Fas 抗原を発現する細胞の生死、形態的变化もしくは生化学的変化のうち少なくともいずれか１つを測定する。
- （２） a. 被験物質もしくは被験物質を含む試料を、Fas リガンドもしくはそれを発現する形質転換体、もしくはその培養上清からなる群より選ばれるいずれかとインキュベートする。
b. a にFas 抗原を発現する細胞を加えて、培養する。
c. Fas 抗原を発現する細胞の生死、形態的变化もしくは生化学的変化のうち少なくともいずれか１つを測定する。
- （３） a. 被験物質もしくは被験物質を含む試料をFas 抗原を発現する細胞とインキュベートする。
b. a に、Fas リガンド、もしくはそれを発現する形質転換体、もしくはその培養上清からなる群より選ばれるいずれかを加えて培養する。

c. Fas 抗原を発現する細胞の生死、形態的变化もしくは生化学的変化のうち少なくともいずれか1つを測定する。

Fas 抗原を発現する細胞の形態的变化もしくは生化学的变化を測定する方法は、その変化を検出できる方法であれば特に限定されない。Fas 抗原を発現する細胞のアポトーシスの有無やその程度を測定するのであれば、Fas 抗原を発現する細胞にあらかじめ取り込ませた⁵¹Crの放出量から測定することができる。また、トリパンブルーを用いた染色や、ホルマザンの生成を指標としたアッセイ（MTT アッセイ、アルマールブルーアッセイ等）を行って、Fas 抗原を発現する細胞のうち生き残った細胞数を測定してもよい。

一般に、細胞表面上に存在する膜型蛋白質が他分子と結合する領域は、細胞外領域であると考えられる。したがって本発明のスクリーニング方法においても、前記式1ないし3、5ないし7、9ないし11のアミノ酸配列を有するポリペプチドもしくはそれらが発現する形質転換体が好適に使用できる。なかでも、前記式1ないし3のアミノ酸配列を有するポリペプチドもしくはそれらが発現する形質転換体を使用することが好ましい。当該スクリーニング方法で使用するFas リガンドは、本発明第7の態様の説明に示した方法で得ることができる。また、Fas リガンドを発現する形質転換体は本発明第5または第6の態様で説明した方法で得ることができる。

本発明第11の態様のスクリーニング方法を使用すれば、Fas リガンドに結合する物質やFas リガンドの発現を調節する物質をスクリーニングすることができる。ここでいう物質には、化合物、ペプチド、蛋白質、抗体、核酸などすべての物質が含まれる。また、これらのスクリーニング方法を使用して、Fas リガ

ドが関与する疾患の診断を行うことも可能である。

例えば、自己免疫疾患の患者より血球細胞や組織由来の細胞を分離し、Fas リガンドもしくはFas リガンドを発現する形質転換体と反応させ、患者から分離した細胞に生じるアポトーシスの程度を観察することにより、その患者のFas 抗原の機能もしくは発現に異常があるかないかを診断することができる。そして、その診断結果を参考に、原因に応じた治療を選択することができる。

なお、Fas 抗原を発現する細胞はいかなる細胞であってもよい。たとえば、エイズウイルス感染細胞のようにウイルスや薬物によってFas 抗原の発現が誘導された細胞でもよいし、Fas 抗原を発現する株化細胞やハイブリドーマ、形質転換体であってもよい。好ましくは、ヒトFas 抗原を発現する細胞であり、特に、ヒトFas 抗原を発現する形質転換体、たとえば、WC8 細胞（イトウ N. (Itoh N.) 等、J. Immunol., 151巻、621-627 頁、1993年）を使用するのが好ましい。

産業上の利用分野

Fas 抗原に結合する物質が単離されれば、それを使用して、人為的に生体内で生じるアポトーシスを調節し、疾患の治療や、診断に使用する事ができる。Fas 抗原に結合して細胞にアポトーシスを誘導するような物質（Fas リガンド）は、生体にとって不必要な細胞を除去するために使用することが可能である。たとえば、先述したように、エイズウイルス感染細胞ではFas 抗原が発現されているので、エイズウイルス感染初期においては、Fas リガンドを使用してアポトーシスを人工的に誘導し、感染細胞を早期に除去する事により、エイズを治療する事が可能であろう。また、ある種の自己免疫疾患では、人為的にFas 抗原を介したアポトーシスを生じさせる事により、自己抗原反応性のT細胞の除去が可能になる

であろう。また、モリモト H. (Morimoto H.)等は、癌細胞にFas 抗原を介したアポトーシスを誘導する事によって、アドリアマイシンやシスプラチンによる制癌効果が相乗的に増強されることを報告している (Cancer Res., 53 巻、2591-2596 頁、1993年) ので、Fas リガンドは癌治療にも使用することができるであろう。

一方、エイズウイルス感染後期の免疫能の低下や、劇症肝炎における肝機能低下は、免疫担当細胞あるいは肝細胞のアポトーシスにより組織の機能が著しく低下した結果と考えられる。このような状態においては、Fas リガンドの作用を抑制し、細胞のアポトーシスを防ぐことが必要になる。したがって、このような病態には、Fas リガンドの発現を抑制する物質やFas リガンドと拮抗的に作用する物質を使用した治療が必要である。

このように、生体内で生じているアポトーシスを人為的に調節するという原理に基づいた治療方法は、Fas 抗原に結合する物質が同定されて初めて可能になる方法である。

Fas 抗原と結合するポリペプチドを、治療や研究に使用するためには、当該ポリペプチドを高純度で、大量に生産することが必要になる。当該ポリペプチドをコードする遺伝子をクローニングすれば、当該ポリペプチドを遺伝子工学的に生産することが可能になり、当該蛋白質を治療薬の主成分として使用したり、抗体の作製に使用することが可能になる。また、遺伝子そのものは、遺伝子治療やアンチセンス医薬の開発に使用したり、トランスジェニックマウス等、アポトーシスが関与する疾患のモデル動物の作製に使用することができる。

発明を実施するための最良の形態

以下に、実施例をもって本発明を一層具体的に説明するが、これらは一例として示すものであり、本発明はこれらにより何等限定されるものではない。

また、以下の記載において用いる略号は、当該分野における慣用略号に基づくものである。

なお、以下に示す実施例中の諸操作は、主にサンプブック等編〔モレキュラークローニング, ア ラボラトリーマニュアル 第2版〕コールドスプリングハーバーラボラトリー, 1989年; 今本文男等編〔組換え遺伝子の細胞への導入と発現〕蛋白質核酸酵素臨時増刊28(14)1983年; 岡田善雄監修〔細胞工学的技術総集編〕実験医学臨時増刊7(13)1989年等を参考として実施した。

(実施例1) キメラ蛋白質の調製

(1) 発現プラスミドpFas-FcII の調製

実施例2で使用する、マウスFas(mFas) 抗原の細胞外領域とヒトIgG1(hIgG1) のFc領域とを結合させたキメラ蛋白質(以下mFas-Fc と称する)の発現プラスミドを以下の方法で作製した。

まず、配列表の配列番号33~34に示すマウス Fas抗原染色体遺伝子のイントロン4のセンス配列(GATTTTCAACCACTCAGTCG)を含むオリゴヌクレオチドプライマーと、イントロン5のアンチセンス配列(ATGCGGCCGCTGGATCCTTTGTATGAAATTGAGTAAT)を含むオリゴヌクレオチドプライマーを化学合成した。後者のオリゴヌクレオチドプライマーにはBamHI サイトを付加してある。

これらのオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、マウス Fas抗原染色体遺伝子を含むプラスミド(pMP3ES, 1992年度、分子生物学会)を鋳型にしてPCR

を行った。その結果、エクソン5の5'末端および3'末端にフランキンگریージョンを有する、383bpのDNA断片が増幅された。

得られた増幅産物をPstIとBamHIで消化し、エクソン5の3'末端とイントロン5の一部を含む128bpのDNAフラグメントを得た。得られたDNAフラグメントでプラスミドpMF1（ワタナベフクナガ(Watanabe-Fukunaga R.)等、J. Immunol. 148巻、1274-1279頁、1992年）のPstI-BamHI DNAフラグメント部分を置き換え、プラスミドpMFXを作製した。

一方、ヒトIgG1重鎖定常領域に対するエクソンを有するプラスミドpMH4（ニシムラ Y. (Nishimura Y.)等、Cancer Res., 47巻、999-1005頁、1987年）をHaeIIで消化し、得られた1.7kbpのDNAフラグメントをpBluescript KS(+)のXbaIサイトにサブクローニングした。

これをHincIIおよびApaIで消化し、ヒンジ、CH2 およびCH3 ドメインをコードするエクソンを含む1.4kbpのDNAフラグメントを得た。このフラグメントを前述のプラスミドpMFXのXbaIサイトに挿入し、プラスミドpFAS-Fcを作製した。プラスミドpFAS-FcをKpnIで切断後、平滑化しNotIで消化し、得られた2.3kbpのDNAフラグメントを、哺乳動物発現ベクターpEF-BOS（ミズシマ S. (Mizushima S.) およびナガタ S. (Nagata S.)、Nucleic Acids Res., 18巻、5332頁、1990年）にライゲートして、目的とする発現プラスミドpFAS-FcIIを得た。

（2）発現プラスミドp $\text{hTNFR}\beta$ -Fcの作製

実施例2で使用する、TNFレセプター β とヒトIgG1のFc領域キメラ蛋白質（以下、 $\text{hTNFR}\beta$ -Fcと称する）の発現プラスミドp $\text{hTNFR}\beta$ -Fcを以下のように構築した。

まず、プラスミドp55TNFr-HG1 (レオスツシャー H. (Leostscher H.)等、J. Biol. Chem., 266 巻、18324-18329 頁、1991年) をKpnIとHindIII で消化し、650bp のDNA フラグメントを調製した。プラスミドp55TNFr -HG1は、人工的スプライスドナー配列 (artificial splice donor sequence) に続くヒトTNF レセプター(p55) の細胞外領域をコードするcDNA配列を含むプラスミドである。

一方、プラスミドpFAS-FcII をHincIIおよびHindIII で消化した。マウス Fas 抗原の細胞外領域をコードする配列を含む約700bp のDNA フラグメントを、前述の650bp のKpnI-HindIIIフラグメントと入れ換え、目的とするプラスミドp β hTNFR β -Fc を得た。

(3) 発現プラスミドpBF -FcIの調製

実施例10で使用する、ヒト Fas抗原の細胞外領域とヒトIgG1のFc領域キメラ蛋白質 (以下、hFas-Fc と称する) の発現プラスミドpBF-FcI を以下のように構築した。

まず、ヒト Fas抗原をコードするDNA (イトウ N. (Itoh N.)等、Cell, 66巻、233-243 頁、1991年) を含むプラスミドpBLF58-1をXhoIとBamHI で消化し、700bp の断片を得た。次にキメラ蛋白質mFas-Fc の発現ベクター構築に用いたpFas-Fc をXhoI、BamHI で消化し、先述の700bp の断片を挿入した (pBHF -C1)。

一方、pBLF58-1を鋳型とし、配列表の配列番号35に示すセンスプライマー 1 (ATGCCCAAGTGA CTGACATCAACT) と配列表の配列番号36に示すアンチセンスプライマー 1 (GCCGGATCCAGGAAGTGGCAAAGCATTACCTTCCTCTTGCACTTGCTG)を使用してPCR

を行い、ヒト Fas抗原の細胞外領域に、マウス Fas抗原染色体遺伝子のイントロン5の配列、BamHI サイトを付加した断片を調製した。

このPCR 産物をMscIとBamHI で消化し、得られた360bp のDNA 断片をMscIとBamHI で消化したpBHF-C1 に挿入した。ついで、形成されたプラスミドをKpnIで切断後、平滑化し、NotIで消化し、ヒトFas 抗原の細胞外領域、ヒトIgG1のFc領域をコードするDNA 断片を得た。この断片を、BstXI で切断後平滑化し、かつNotIで切断した pEF-BOSに挿入し、ヒト Fas-Fc 発現ベクター pBF-Fc1を得た。

(4) キメラ蛋白質の生産と精製

プラスミドpFas-FcII およびpTNFR β -Fc でそれぞれ COS-7細胞、BTS-1 細胞(セディビー J. M. (Sedivy J. M.), Biol. Technology, 6 巻、1192-1196 頁、1993年)を形質転換させた。また、プラスミド pBF-Fc1でCOS-7 細胞を形質転換させた。

COS-7 細胞の形質転換は、フクナガ R. (Fukunaga R.) らが報告したDEAE-デキストラン法で行った(フクナガ R. (Fukunaga R.)等、Cell, 61巻、341-350 頁、1990年)。形質転換の後、このCOS-7 細胞を、10%のFCS を含む培地中で24時間インキュベートし、さらに、血清不含の培地中で48時間および72時間インキュベートした。インキュベート後の培養上清液を集め、遠心分離操作を行った後、0.45 μ mのフィルターを通して細胞の破砕物を除き、プロテインA-セファロース4Bカラム(ファルマシア社)クロマトグラフィーにより、キメラ蛋白質mFas-Fc、hTNFR β -Fc、hFas-Fc をそれぞれ精製した。

一方、BTS-1 の形質転換は、エレクトロポレーション(ポッター H. (Potter

H.)等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81巻、7161-7165 頁、1984年) によって行った。すなわち、プラスミドpFas-FcII をApaLI で、プラスミドphTNFR β -Fc をSacIで消化した後、各々のプラスミドDNA 50 μ g をそれぞれ、XhoIで切断したpSTneoB 5 μ g とともに、 1×10^7 個の細胞を形質転換した。10%FCS と300 μ g/mlのG-418 とを含むダルベッコ変法イーグルMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, 以下D-MEM と略す) で10日間選択を行った後、G-418 耐性クローンを分離し、39.5°Cで増殖させた。

目的とするキメラ蛋白質を生産するクローンを同定するため、クローンの一部を33°Cで3日間培養し、培地中に分泌されたキメラ蛋白質を、酵素免疫法(ELISA)で検定した。検定に使用したELISA では、捕獲抗体として抗ヒト IgG-Fc 抗体(カッペル 55071)を、検出抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG-Fc 抗体(ジャクソン研究所、109-035098)を用いた。

mFas-Fc および hTNFR β -Fcを効率的に生産する形質転換体の一つずつ、39.5°Cで増殖させた後、15cmプレートに50%コンフルエントとなるように植え込んだ。33°Cで1週間培養したのち、培養上清からmFas-Fcと hTNFR β -FcをプロテインA-セファロース4Bカラム(ファルマシア社)クロマトグラフィーにより、精製した。

精製後のmFas-Fc をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で分析したところ、還元下で分子量55kDの位置にバンドが認められ、非還元下においては、分子量110kD の位置にバンドが認められた。これは、得られたキメラ蛋白mFas-Fc が、S-S 結合によるホモダイマーとして存在していることを示している。

(実施例2) フローサイトメトリーによる解析およびd10S-2細胞株の選択

(1) キメラ蛋白質のビオチン化およびFITC標識

スルホサクシニミジル 6- (ビオチンアミド) ヘキサノエート(NHS-LC-ビオチン、ピアス社、21335)を用い、その操作手順書に従って、mFas-Fc および hTNFR β -Fc をビオチン化した。

また、1 mgの hTNFR β -Fc と20 μ g のFITCとを、1 mlの50mM炭酸ナトリウム緩衝液(pH9.5) 中で混合し、室温で4時間反応させた後、未結合のFITCをセファデックスG-25M を用いたカラムクロマトグラフィーで除去し、FITC標識 hTNFR β -Fc を得た。

(2) フローサイトメトリー

PC60-d10S 細胞(以下、d10Sと略す。ルービエ E. (Rouvier E.) 等、J. Exp. Med., 177 巻、195-200 頁、1993年)を染色用溶液(2%FCS と0.02%NaN₃とを含むリン酸緩衝生理食塩水(以下、PBS と略す))を用いて洗浄した。約 1×10^6 細胞を、5 μ g/mlのラット抗マウスFc γ RII ブロッキング抗体(ファーマジェン社)を含む染色用溶液50 μ lに懸濁した。これを96ウェルプレートの各ウェルに添加し、氷上で10分間インキュベーションした。50 μ lの20 μ g/ml ビオチン化mFas-Fc を各ウェルに加え、氷上でさらに30分間インキュベーションした。染色用溶液で洗浄の後、フィコエリスリン標識ストレプトアビジン(25倍希釈、ベクトン-ディッキンソン社)を加え、さらに染色用溶液を加えて 100 μ l とし、氷上で30分間反応させた。

細胞を染色用溶液で洗浄した後、FACScan (ベクトン-ディッキンソン社)を用いたフローサイトメリーによって解析を行った。この結果を図1aに示す。対照

は白抜部分として、また PMAとイオノマイシンで4時間処理する前に染色したものを影付された部分として、さらに、PMAとイオノマイシンで4時間処理した後に染色したものを着色部分で表した。その結果、蛍光強度のわずかなシフトが認められ、当該細胞がビオチン化mFas-Fc で染色された事が確認された。

一方、d10S細胞を、ビオチン化 hTNFR β -Fc で同様に染色し、フローサイトメトリーで分析したところ、染色は認められなかった。これらの結果、実施例1で調製したmFas-Fc は、d10S細胞上の Fasリガンドに特異的に結合することが確認された。

(3) d10S-2細胞株の選択

(2) で、高い蛍光活性が認められたd10S細胞、 $1 \sim 3 \times 10^7$ 個に、前述の方法でビオチン化mFas-Fc およびFITC標識 hTNFR β -Fc を反応させ、次いで、フィコエリスリン標識ストレプトアビジンで染色し、FACStar (ベクトン・ディッキンソン社) でソーティングした。フィコエリスリン蛍光を高いレベル(上位0.3~0.5 %)で発する細胞を集め、10%FCS と50nMの2-メルカプトエタノールを含むD-MEM で増殖させた。

得られた細胞に対し、上記操作を更に繰り返した結果、選択された細胞群をd10S-2と名づけた。d10S-2について、d10Sと同様にフローサイトメトリーを行った結果を図1bに示す。このd10S-2は、刺激剤存在下、非存在下両方において、高いFasリガンド発現量を示す細胞が極めて濃縮された細胞群である。

(実施例3) cDNAライブラリーの構築

実施例2で得られたd10S-2細胞を10%FCS を含むD-MEM 中で 2×10^5 細胞/mlまで増殖させ、20ng/ml のPMA と1 μ g/mlのイオノマイシンで37°C、3時間刺激

した。グアニジンイソチオシアネート／アシッドフェノール法（コムシンスキー P. (Chomczynski P.) およびサシー N. (Sacchi N.), Anal. Biochem., 162 巻、156-159 頁、1987年）によって総RNA を分離した後、オリゴ(dT)－セルロースカラムクロマトグラフィーを2回繰り返しpoly(A)RNAを選択的に分離した。ランダムヘキサマーあるいはオリゴ(dT)プライマーを用い、イトウ N. (Itoh N.)等、(Cell, 66巻、233-243 頁、1991年)の方法で2本鎖cDNAを合成した。

得られた2本鎖cDNAにBstXI アダプターを付加し、1%アガロースゲルを用いた電気泳動で分子量分画を行った。1.5kbp以上の大きさのcDNAを回収し、BstXI で切断したpCEV4 ベクター（イトウ N. (Itoh N.) 等、Cell, 66巻、233-243 頁、1991年）にライゲートした。

ライゲートプロダクトを使用し、エレクトロポレーション（ドワー W. (Dower W.) 等、Nucleic Acids Res., 16巻、6127-6145 頁、1988年）により大腸菌DH10 B 細胞（ギブコ BRL(Gibco BRL) 社）を形質転換した。オリゴ(dT)でプライムさせたcDNAライブラリーから得た約 1.0×10^6 個の独立したクローンと、ランダムヘキサマーでプライムさせたcDNAライブラリーから得た約 1.3×10^6 個のクローンを混合し、プラスミドDNA を調製して、COS-7 細胞の形質転換に使用した。

（実施例4）パンニング操作によるcDNAクローンの濃縮

実施例3で得られたプラスミドDNA でエレクトロポレーション法により、COS-7細胞を形質転換した。すなわち、 5×10^6 個のCOS-7 細胞を K-PBS⁻（30.8m NaCl, 120.7mM KCl, 8.1mM Na₂HPO₄および1.46mM KH₂PO₄を含む緩衝液）で洗浄し、0.4ml の5mM MgCl₂を添加したK-PBS（K-PBS⁺）に細胞を懸濁した。

次に、0.4ml の K-PBS⁺ に40 μ g のプラスミドDNA を溶解し、それを細胞懸濁液に加え、氷上で10分間インキュベーションした。細胞に960 μ F のキャパシタンスで230Vの電圧をかけエレクトロポレーションし、氷上で10～15分間インキュベーションした後、細胞懸濁液を5mlの血清無添加の冷D-MEM で希釈し、さらに室温で30分間インキュベーションした。その後、この細胞を2つの10cmプレートに植え込み、10%FCS を含むD-MEM 中で37°Cで60時間培養した。

以上の方法で、総数 1.2×10^8 個の COS-7細胞を形質転換し、10cmプレートで培養した。1 プレートあたり5mlの0.5mM EDTAおよび0.02%NaN₃を含むPBS (PBS/EDTA/NaN₃) を加え、37°Cで30分間インキュベーションし、プレートよりこれらの細胞を剝した。剝した細胞を、3mg/mlのBSA および2.5 μ g /mlの抗マウスFc γ IIレセプター抗体とを含む PBS/EDTA/NaN₃に $5 \sim 7 \times 10^6$ 個/mlの細胞濃度で再度懸濁した。氷上で10分間インキュベーションした後、mFas-Fc を終濃度が4 μ g /mlになるように加え、氷上で60分間インキュベーションした。この細胞を氷冷したPBS で洗浄し、50mMヘプス緩衝液 (pH8.3)および0.2mM ビス(スルホサキシニミドイル) スベレート (BS³、ピアス社) とを含むPBS 中に $5 \sim 7 \times 10^6$ 個/mlの細胞濃度になるよう浮遊した。

氷上で30分間インキュベーションしたのち、1Mトリス-塩酸 (以下、Tris-HCl と略す、pH8.0)を終濃度が50mMとなるよう添加し、さらに氷上で10分間インキュベーションした。PBS で洗浄したのち、細胞を3mg/ml のBSA を添加したPBS /EDTA /NaN₃ 30mlに懸濁し、ナイロンメッシュ (ポアサイズ100 μ m) で濾過を行い凝集物を取り除いた。

この細胞懸濁液を、抗ヒト IgG-Fc 抗体 (カッペル 55071) を固定化した30個

の10cmパンニング用プレートに分配した。室温で2時間インキュベーションしたのち、PBS で穏やかに洗浄することにより非付着細胞を取り除き、イトウ N. (Itoh N.)等の方法で染色体外DNA を付着細胞から抽出した (Cell, 66巻、233-243 頁、1990年)。以上の1回目のパンニング操作で得られたDNA を用い、エレクトロポレーションにより大腸菌を形質転換させ、 4.1×10^6 個のコロニーを得た。これらよりプラスミドDNA を調製し、 9.6×10^7 個の COS-7細胞 (60プレート) を形質転換した。

これをパンニング用プレート30枚に分配して2回目のパンニングを行い、1回目と同様に付着細胞からDNA を調製した。回収したプラスミドDNA を用い大腸菌を形質転換し、 8.0×10^6 個のクローンを得た。これらよりプラスミドDNA を調製し、 4.0×10^7 個の COS-7細胞 (10プレート) を形質転換した。

これをパンニング用プレート30枚に分配して3回目のパンニングを行った。1回目、2回目と同様に付着細胞からプラスミドDNA を回収し、大腸菌を形質転換させ、 3.8×10^6 個のクローンを得た。これらより調製したプラスミドDNA で 1.0×10^7 個の COS-7細胞 (25プレート) を形質転換し、10枚のパンニング用プレートに分配して、4回目のパンニング操作を行った。

以上の4回目のパンニング操作を終了した後、COS-7 細胞から染色体外DNA を調製し、大腸菌を形質転換させた。各菌体クローンより、プラスミドDNA を調製して解析したところ、48クローン中16クローンが、1.0kbp以上のインサートを有していた。これらのプラスミドDNA をそれぞれCOS-7 細胞に導入した後、COS-7 細胞をビオチン化mFas-Fc で染色し、実施例2の方法でフローサイトメトリーを行った。その結果、5つのクローンが染色された。この5クローンのうちの1つ

で、1.6kbpのインサートをもつクローン、pTN24-15で形質転換させたCOS-7 細胞 (COS/pTN24-15)の結果を図1cに示した。このpTN24-15で形質転換させたCOS-7 細胞はビオチン化 hTNFR β -Fc では、染色されなかった。また、外来遺伝子を含まないpCEV4 で形質転換させたCOS-7 細胞はビオチン化mFas-Fc で染色されなかった。

(実施例5) DNA 配列の決定およびその解析

実施例4で得られた5クローンについて制限酵素マッピングをしたところ、それらが互いにオーバーラップしていることがわかった。そこで、この5クローンのうちの1つ、pTN24-15をさらに詳しく解析した。DNA 配列の決定はDNA シーケンサー (370A型、パーキンエルマージャパン (株)) とTaq ダイ デオキシ サイクル シーケンシング キット (Taq Dye Deoxy cycle sequencing kit, パーキンエルマージャパン (株)) を使用して行った。

クローンpTN24-15の塩基配列と、それから推定したアミノ酸配列を図2、3と、配列表の配列番号25に示した。このcDNAは、1623塩基から成り、1つのオープンリーディングフレームを有していた。

また、この配列中には、配列表の配列番号37に示すコザック M. (Kozak M., J. Cell Biol., 115巻、887-903 頁、1991年) によって提唱された配列(CCA/GCCAT GG) は認められなかったが、翻訳開始部位は塩基番号74~76に位置するATG と考えられた。このオープンリーディングフレームは、908 ~910 の終止コドンTAA で終わっている。そして、このcDNAは、278 アミノ酸をコードすることがわかった。アミノ酸配列から推定されるペプチド部分の分子量は31,138であり、等電点は9.53である。

このcDNAがコードする278 アミノ酸のうちN末端側の77アミノ酸は、極めてプロリンに富んだ配列であった。N末端付近に典型的なシグナル配列は確認できなかったが、ヒドロパシー分析 (Hydropathy Analysis) により、Fasリガンドは、プロリンリッチな領域に続いて、おそらくトランスメンブランアンカーとして機能すると考えられる22個の疎水性アミノ酸を有することがわかった。シグナル配列が欠如しており、内部に疎水性ドメインを有する構造から、FasリガンドはII型のトランスメンブラン蛋白質であることが示唆された。

細胞外領域として推定される領域はC末端側に存在し、179 アミノ酸から成り、4つのN-グリコシレーションサイト (Asn-X-Ser /Thr) を含むことが確認された。これらのグリコシレーションサイトは、図2、図3中に*で示した。

cDNAライブラリー作成に使用したd10S-2細胞は、ラットとマウスのハイブリドーマである。FasリガンドcDNAの由来を決定するために、FasリガンドcDNAの3'末端ノンコーディング領域からプライマーを設計、合成し、ラットとマウスの脾臓細胞から得た染色体DNAを鋳型としてPCRを行った。すなわち、配列表の配列番号25の塩基番号1006～1025、1305～1324をセンスプライマー2および3 (配列表の配列番号38および39) とし、配列表の配列番号25の1327～1346および1543～1562をアンチセンスプライマー2および3 (配列表の配列番号40および41) として用いた。その結果、ラット染色体DNAでのみ、サイズ341bpと258bpのバンドが得られた。これらの結果は、クローンpTN24-15より得られたcDNAがd10Sハイブリドーマ細胞のラット遺伝子に由来することを示している。

なお、ハナハンの方法 (Hanahan D. 著、Techniques for Transformation of E.

coli. In DNA Cloning, vol.1, グローバー D. M. (Glover D. M.)編、109-136 頁、IRL 出版(IRL Press), 1985 年) に準じて、上記pTN24-15で大腸菌を形質転換させ、得られた形質転換体DH10B (pTN24-15)を工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託した(FERM P-13953)。さらに、平成6年10月27日付で原寄託から国際寄託に移管した(FERM BP-4848)。

(実施例6) ノーザンハイブリダイゼーション

mRNA分離キット(ファルマシア)を用い、d10S、d10S-2、ラット各組織(脳、肺、心臓、肝臓、小腸、腎臓、卵巣、精巣、骨格筋)および細胞(脾細胞、胸腺細胞)からpoly(A)RNAを調製した。50%ホルムアミド中で65°Cで5分間加熱しRNAを変性させ、6.6%のホルムアルデヒドを含む1.5%アガロースゲルで電気泳動を行い、ニトロセルロースあるいはナイロン膜(シュライヒャー アンド シュエル(Schleicher and Schuell)社)に転写させた。

プローブとして、実施例4で得られたpTN24-15の43~967のDNA配列(配列表の配列番号42)を含む925bpの2本鎖DNAフラグメントをPCRにより調製し、ランダムプライマーラベリングキット(ベーリンガー マンハイム社)によって³²P標識した。ヒトEF1 α のcDNA(ウエツキ T. (Uetsuki T.) 等、J. Biol. Chem., 264巻、5791-5798 頁、1989年)の1.8kbpの長さを有するBamHI フラグメントの³²P標識物を、コントロールプローブとして使用した。ハイブリダイゼーション操作は、ハイストリンジェンシー (high stringency) の条件下でサムブルック J. (Sambrook J.) らの方法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, ニューヨーク(New York), 1989年) を用いた。

図4には、d10S、d10S-2、d10S-16各細胞をPMAとイオノマイシンで刺激した場合と刺激しない場合の、ノーザンハイブリダイゼーションの結果を示した。図4から明らかなように、d10Sから得たpoly(A)RNAは、約2.0kbpの弱いハイブリダイゼーションバンドを示した。このバンドのシグナルの強さは、PMAやイオノマイシンでd10S細胞を刺激すると増加する。d10S-2細胞は、PMAとイオノマイシンで刺激したd10Sよりも約4倍強いシグナルを示し、d10S-2細胞ではFasリガンドmRNAの発現量がPMAとイオノマイシンで刺激したd10S細胞よりも、約4倍高いことが示唆された。

また、実施例2の操作を16回繰り返して得たd10S-16細胞では、mRNA発現量はd10S細胞よりも約100倍多かった。d10S-16の細胞障害活性は、d10S細胞より100倍高く、FasリガンドmRNA発現量の増加は、細胞障害活性、mFas-Fcで染色される強さと正の相関関係にある事が分かった。

図5には、ラットの脾臓および胸腺より調製した脾細胞、胸腺細胞の調製直後（培養前）、刺激剤なしで37℃で8時間培養後（未処理）、各刺激剤を加えて37℃で8時間培養後のノーザンハイブリダイゼーションの結果を示した。ラットの脾細胞では、FasリガンドmRNAの弱い発現が認められた。ラット脾細胞をPMAとイオノマイシン、もしくはConAとIL-2で8時間刺激した時、FasリガンドmRNAの量は著しく増加した。ラット胸腺細胞では、培養前及び未処理の場合FasリガンドmRNAは、ほとんど発現していなかった。しかしながら、ラット胸腺細胞をPMAとイオノマイシン、もしくはConAとIL-2で刺激すると、FasリガンドmRNAの発現量は、脾細胞におけるそれと同等にまで増加した（図5）。

ラットの各組織におけるFasリガンドmRNAの発現量を調べた結果を図6に

示す。図 6 に示したように、精巢に於いて約2.0kbpの強いシグナルを有するバンドが確認された。小腸、腎臓、肺では、普通もしくは弱いシグナルを有するバンドが確認されたが、その他の組織では Fas リガンド mRNA の発現は認められなかった。

なお、すべての mRNA がインタクト (intact) であることは、ヒト EF 1 α の cDNA プローブと再ハイブリダイゼーションした全ての細胞および組織において、1.8kbp のバンドが認められたことから明らかである (図 4、5 および 6 の下段)。

(実施例 7) Fas リガンドの生化学的解析

d10S-12細胞で発現している Fas リガンド及び pTN24-15 で形質転換させた COS-7 細胞で発現している Fas リガンドの生化学的性状を検討した。

d10S-12細胞は、実施例 2 の操作を 12 回繰り返して得られた細胞集団である。まず、d10S-12 あるいは pTN24-15 で形質転換させた COS-7 細胞の細胞表面蛋白を D-ビオチニル- ϵ -アミノカプロン酸 N-ヒドロキシサクシニミドエステル (biotin-CNHS-ester、ベーリンガーマンハイム社) 用いるマイヤー (Meier) らの方法でビオチン化した (Anal. Biochem., 204 巻、220-226 頁、1992 年)。なお、pTN24-15 で形質転換させた COS-7 細胞の対照として、外来遺伝子を含まない pCEV4 ベクターで形質転換させた COS-7 細胞を用いた。細胞 (7.5×10^6 個) を 1 ml のライシスバッファー (1% NP-40、50mM Tris-HCl (pH 8.0)、150mM NaCl、1mM (p-アミノフェニル) メチルスルホニルフロライド塩酸塩 (APMSF)、1 μ g/ml ペプスタチンおよび 1mM ロイペプチンを含む) 中に加え氷上で 30 分間インキュベーションし、細胞を溶解させた。

14,000rpm で 15 分間遠心操作を行った後、上清を 10 μ g/ml の hTNFR β -Fc と氷

上で60分間インキュベーションし、さらに5%液量のプロテインA-セファロース4Bと、4℃で60分間インキュベーションした。プロテインA-セファロース4Bを除去したのち、上清に10μg/mlのmFas-Fcを加え、氷上で60分間インキュベーションした。1%液量のプロテインA-セファロース4Bをこの混合物に加え、4℃で一夜インキュベーションした。遠心操作の後、沈降物をライシスバッファーで洗浄し、5%の2-メルカプトエタノールを含む20μlのラエムリ(Laemmli)の試料用緩衝液(2%SDS、10%グリセリンおよび0.002%ブロモフェノールブルー(BPB, Bromophenol blue)を含む62.5mM Tris-HCl(pH6.3))に再懸濁し、95℃で2分間加熱した。次いで、0.1%SDSを含む10-20%グラジエントポリアクリルアミドゲルを用いてグラジエントゲル電気泳動を行い、PVDF膜へ転写し、ECLシステム(アマーシャム社)で検出した。

図7に、mFas-Fcとd10S-12、COS-7/pCEV4またはCOS-7/pTN24-15との免疫沈降の結果を示す。図7に示したように、mFas-Fcは、d10S-12細胞ライセート中の分子量約40,000の蛋白質と免疫沈降し、一方、pTN24-15で形質転換させたCOS-7細胞(COS-7/pTN24-15)からのライセート中では分子量約37,000-45,000の蛋白質とともに免疫沈降した。外来遺伝子を含まないpCEV4ベクターで形質転換させたCOS-7細胞(COS-7/pCEV4)では、免疫沈降物は認められなかった。

pTN24-15で形質転換させたCOS-7細胞とd10S-12細胞で免疫沈降した蛋白質の分子量は、いずれも前述したアミノ酸配列より推定される分子量よりも大きかった。これら2つの細胞間での分子量の差、およびアミノ酸配列から推定される分子量との差は、4つあるN-グリコシレーションサイトのいくつかにおいてグリコシレーションに違いが生じているためと考えられた。

(実施例 8) Fasリガンドの細胞障害活性の測定

(1) エフェクター細胞による細胞障害活性の測定

d10S細胞およびpTN24-15で形質転換させた COS-7細胞の、細胞障害活性を、W4細胞（オガサワラ J. (Ogasawara J.) 等、Nature、364巻、806-809 頁、1993年）をターゲット細胞として測定した。W4細胞は、マウス Fas抗原を発現させるようにマウス WR19L細胞を形質転換させた細胞である。この WR19L細胞は、マウス Fas抗原を殆んど発現せず、TNF α の細胞障害作用に感受性の細胞である。

細胞障害活性の検定は、ルービエ E. (Rouvier E.) 等の方法に準じて行った (J. Exp. Med., 177 巻、195-200 頁、1993年)。

まず、d10S細胞 ($2.5 \sim 5 \times 10^5$ 細胞/ml) を、10ng/ml の PMA (シグマ社) およびカルシウムイオノフォアであるイオノマイシン (カルビオケム社) 500ng/ml が添加された10%FCS 含有D-MEM 中で、37°Cで3時間インキュベーションした後、D-MEM で洗浄し、エフェクター細胞とした。また、COS-7 細胞をpTN24-15でDEAE-デキストラン法で形質転換し、エフェクター細胞とした。一方、 $100 \mu\text{l}$ の10%FCS を含むRPMI1640中で、 $20 \mu\text{Ci}$ の [$^5\text{1Cr}$] クロム酸ナトリウム (アマーシャム社) と共に 1×10^6 個の WR19L細胞あるいはW4細胞を37°Cで2時間インキュベートした。培養液 (RPMI1640) で洗浄した後、これらの細胞を標的細胞として使用した。

d10Sをエフェクター細胞とし、WR19LまたはW4を標的細胞としたときの特異的細胞障害活性を図8に示した。また、エフェクター細胞を COS/pTN24-15、COS/pCEV4 としたときの特異的細胞障害活性を図9に示した。

標的細胞 1×10^4 個とエフェクター細胞とを、さまざまな比で丸底のマイクロタイタープレートの各ウェル中で混合した。このとき全液量が計 $200 \mu\text{l}$ になるようにした。700rpmで2分間、プレートの遠心操作を行ったのち、 37°C で4時間インキュベーションした。さらに、1,200rpmで5分間、プレートの遠心操作を行い、各ウェルより上清 $100 \mu\text{l}$ を分取して γ カウンターを用いて放射活性を測定し、特異的細胞溶解率を算出した。

^{51}Cr の自然放出は、培地のみで標的細胞をインキュベーションすることにより決定し、一方、最大放出量は、標的細胞に0.1 %となるようにトライトンX100を加えることにより決定した。また、特異的細胞溶解率は次の式により計算した。

$$\text{特異的細胞溶解率} = \frac{\text{実測の}^{51}\text{Crの放出量} - ^{51}\text{Crの自然放出量}}{^{51}\text{Crの最大放出量} - ^{51}\text{Crの自然放出量}}$$

図9に示したように、pTN24-15で形質転換させたCOS-7細胞(COS/pTN24-15)は、W4細胞を溶解させたが、外来遺伝子を含まないpCEV4ベクターで形質転換させたCOS-7細胞(COS/pCEV4)では、W4細胞の溶解は認められなかった。pTN24-15で形質転換させたCOS-7細胞(COS/pTN24-15)と、d10S細胞の細胞障害活性を、W4細胞に対するE/T(エフェクター細胞/標的細胞)比で比較すると、前者は後者に比べ少なくとも10倍高い活性を有していた。また、d10S細胞およびpTN24-15で形質転換させたCOS-7細胞(COS/pTN24-15)は、ともにWR19L細胞に対しては細胞障害作用を示さなかった(図8、9)。

(2) 細胞の培養上清の添加による細胞障害活性の検討

図10に、COS/pTN24-15 または COS/pCEV4の培養上清を種々の濃度で添加したときの標的細胞 (W4, WR19L) に対する細胞障害活性を示した。

pTN24-15で形質転換させたCOS-7 細胞(COS/pTN24-15)の培養上清の細胞障害活性をみたところ、W4細胞に対し顕著な細胞障害活性が認められたが、WR19L細胞に対しては細胞障害活性は認められなかった(図10)。これは、COS-7 細胞上で発現されたりコンビナント Fasリガンドが切断され、可溶型になっていることを示す結果である。

(3) mFas-Fcおよび hTNFR β -Fcによる細胞障害活性の阻害

さらに、mFas-Fc、hTNFR β -Fcをアッセイ系に加えて、エフェクター細胞による細胞障害活性の変化を検討した。この結果を図11に示す。

図11に示すように、Fasリガンドを発現する COS-7細胞(COS/pTN24-15)の細胞障害活性は、d10S細胞と同様に、10 μ g/mlのmFas-Fcで阻害され、10 μ g/mlのhTNFR β -Fcでは阻害されなかった。

(実施例9) 染色体DNA のフラグメンテーションについての検定

24ウェルプレート内の8 \times 10⁴ 個のCOS-7 細胞を、10 μ g のpTN24-15で形質転換した。トランスフェクトの72時間後、2 \times 10⁵ 個のWR19L 細胞あるいはW4細胞(オガサワラ J.(Ogasawara J.) 等、Nature. 364 巻、806-809 頁、1993年)をウェルに加え、10%FCS を含むRPMI1640中37°Cで、1~3時間インキュベーションした。WR19LまたはW4細胞のうち、ウェル内壁に付着しない非付着細胞を集め、レイード P. W.(Laird P. W.) らに準じて染色体DNA を調製し(Laird P. W. 等、Nucleic Acids Res.. 19巻、4293頁、1991年)、0.5 μ g/mlの臭化エチ

ジウム存在下でアガロースゲルを使用して電気泳動を行った。

上述の WR19LまたはW4細胞の染色体 DNAの電気泳動の結果を図12に示した。

図12から明らかなように、pTN24-15で形質転換させた COS-7細胞(COS/pTN 24-15)とコカルチャーしたW4細胞では、染色体DNA が、アポトーシスの特徴であるステップラダー様式 (step-ladder fashion) でフラグメント化していた。

DNAのラダーは、インキュベーション後1.0 時間で観察され、インキュベーション後2時間で、ほとんどの DNAが断片化してしまった。

このような DNAのフラグメント化は、外来遺伝子を含まない pCEV4で形質転換させた COS-7細胞とコカルチャーしたW4細胞では認められなかった。さらに、このような DNAの断片化はターゲット細胞に用いたW4細胞およびWR19L 細胞のうちW4細胞でのみ確認され、WR19L細胞では確認されなかった。

(実施例10) アフィニティークロマトグラフィーを用いた Fasリガンドの精製

(1) 細胞表面蛋白質のビオチン化

以下で、トレーサー蛋白質として使用するため、マイヤー (Meier)等の方法 (Anal. Biochem., 204 巻、220 頁、1992年) に従って細胞表面のビオチン化を行った。すなわち、d10S-12 細胞を50 μ g/mlの NHS-LC-ビオチンを含む10mM ホウ酸ナトリウム緩衝生理食塩水で、 1×10^7 細胞/ml になるように懸濁し、室温で15分間インキュベートした。最終濃度が10mMになるように塩化アンモニウムを添加し、反応を停止後、150mM のNaClを含む50mM Tris-HCl(pH8.0 、以下TBSと略す) で3回洗浄し、細胞表面蛋白質をビオチン化した。

(2) mFas-Fcアフィニティークラムの調製

実施例1で作製したキメラ蛋白質mFas-Fcの精製標品4mgを4mlのPBS(pH7.4)

に溶解した後、2mlのプロテインA-セファロース4Bと混合し、4℃で1時間結合させた。遊離の蛋白質を除去するため、樹脂をTBSで3回、次に200mMのホウ酸ナトリウム溶液(pH9.0)で1回洗浄した。さらに、ジメチルピメリミデート(DMP)を含む200mM、ホウ酸溶液(pH9.0)で室温45分間インキュベートすることにより、樹脂にmFas-Fcを共有結合させた。

(3) Fasリガンドの精製

実施例2の操作を12回繰り返して得られたd10Sのサブライン、d10S-12を、50nMの2-メルカプトエタノールと20mMヘベス(pH7.4)を添加した10%FCS含有D-MEMを培地を用いて、37℃にて、10本のローラーボトルで培養した。細胞密度が 2×10^5 細胞/mlに到した時点で10ng/mlのPMAと500ng/mlのイオノマイシンを添加し、さらに4時間インキュベートした。

培養後の細胞浮遊液を250 × gで20分間遠心後ペレットを回収し、PBSで3回、TBSで1回洗浄した。ペレットの状態、-80℃で保存し、以下の細胞膜画分の調製に使用した。また、一部を(1)の細胞表面蛋白質のビオチン化に使用した。

凍結した細胞ペレットは4倍量の1mMのp-アミノフェニルメタンсульフォニルフルオリドハイドロクロライド(p-aminophenyl methanesulfonyl fluoride hydrochloride, APMSF)、1μg/mlペプスタチン、1μg/mlロイペプチンおよび0.02% NaN₃を含む0.3Mショ糖溶液中で、ウルトラトラックスT25(Ultra-Turrax T25, ヤンクウントクンケル、スタウフェン(Janke & Kunkel, Staufen)社)を用い、ブルーポジションで、氷上で2分間、破碎した。

1,000 ×g で20分間、4℃にて遠心し、核および破碎されていない細胞を除去した。次に上清を100,000 ×g で90分間、4℃にて遠心し、膜分画を得た。この膜分画を40mlのライシスバッファー（1%NP-40、1mM APMSF、1μg/mlペプスタチンおよび1μg/mlロイペプチンを含むTBS）に溶解し、4℃で一晩振とうし可溶化した。可溶化した膜分画を100,000 ×g で60分間、4℃にて遠心し、上清を-80℃で保存した。細胞表面タンパクをビオチン化した細胞も同様に処理し、-80℃で保存した。

Fasリガンドのトレーサーとして可溶化した膜分画 100mlに、ビオチン化した細胞からの可溶化膜分画10mlを添加した。その混合物を1%NP-40を含むTBS で平衡化したmFas-Fcカラム（1.4ml）にアプライした。

カラムを1%NP-40を含むTBS 50mlおよび0.1%NP-40を含むTBS 50mlで洗浄後、1M NaCl および0.1%NP-40を含む50mM Tris-HCl(pH8.0)で Fasリガンドを溶出した。

1mlずつフラクションを集め、各フラクションの10μlをSDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)に供した後、PVDF膜に転写した。ビオチン化した蛋白質は、HRPO標識ストレプトアビジンと反応させて染色し、使用説明書通りに ECLシステム（アマーシャム社）で検出した。

40kDのビオチン化 Fasリガンドを含む画分をプールし、10μlのConA-アガロースビーズ（EY ラボラトリーズ社）と4℃で1晩インキュベートした。0.1%NP-40を含むTBSで4回洗浄後、0.1%NP-40および2M α-メチルマンノシドを含むPBS 200μlで Fasリガンドを溶出し、精製 Fasリガンドを得た。

(4) SDS-PAGE

(3) で得た精製 Fasリガンドを用いて0.1 %SDS を含む10-20%グラジエントポリアクリルアミド電気泳動を行い、シルバーステイニングキット（和光純薬工業（株））で染色、あるいはPVDF膜に転写後、ECLシステムでバンドを検出した。Fasリガンド精製の結果を図13に示す。図中、レーン1は、銀染色の結果を、レーン2はECLシステムでの検出結果である。

図13に示したように、精製された Fasリガンドは銀染色および ECLシステムとともに非還元下、分子量約40kDの1本のバンドとして検出された。

(5) 細胞障害活性

実施例8の方法に従って、精製 Fasリガンドの細胞障害活性を測定した。ただし、これまでの細胞障害活性でエフェクター細胞として用いられたd10S細胞およびpTN24-15で形質転換させた COS-7細胞の代わりに、(3) で得られた精製 Fasリガンドを使用し、標的細胞であるW4細胞および WR19L細胞に対する特異的細胞溶解率を指標として、細胞障害活性を測定した。精製された Fasリガンドの細胞障害活性の検討結果を図14に示す。

図14より明らかなように、Fas抗原を発現していない WR19L細胞に対しては細胞障害活性は認められなかったが、Fas抗原を発現しているW4細胞に対しては濃度依存的な細胞障害活性が確認された。

(実施例11) ラット FasリガンドDNA の一部を使用したスクリーニング

(1) ヒト染色体DNA ライブラリーのスクリーニング

ヒト（胎盤）染色体DNA フェージライブラリー（EMBL3 SP6 /T7、クローンテック(Clontech)社）を指示菌（菌名VCS257）に感染させ、軟寒天と混合し、

寒天プレートに重層した。37°Cにて一晩インキュベーションし、ファージブランクを形成させた。これを一旦、4°Cで約4時間冷却し、その後、ファージをニトロセルロースフィルターに転写した。

一方、実施例4で得たプラスミドpTN24-15を鋳型として、センスプライマー4 (AGAACTCCGTGAGTTCACCA)およびアンチセンスプライマー4 (CAATATTCCTGGCATCCATG)配列(配列表の配列番号43および44)を用いてPCRを行い、ラット FasリガンD cDNAの細胞外領域をコードするcDNA(配列表の配列番号25の塩基番号400 から967番)を増幅させた。ランダムプライマーラベリングキット(ベーリンガーマンハイム社)を使用して実施例6の方法で増幅産物を³²P標識して、プローブ1(配列表の配列番号45)を作製した。配列表の配列番号25の5'末端側、すなわち配列表の配列番号25の塩基番号43から233をPCRにより増幅させ、得られた増幅産物を上述のように³²P標識して、プローブ2(配列表の配列番号46)を作製した。

ショウ(Shaw)等の方法(Nucleic Acids Res., 11巻, 555-573頁, 1983年)を一部改変して、上記の各プローブとニトロセルロースフィルターとをハイブリダイゼーションさせた。すなわち、フィルターを、65°Cで一晩、0.1% SDSを含む3×SSCで洗浄し、次いで、50%ホルムアミド、5×デンハルト溶液、0.1% SDS、250 μg/mlの変性サケ精子DNAを含む5×SSCP中で、42°C、5時間プレハイブリダイゼーションした。次に、50%ホルムアミド、1×デンハルト溶液、0.1% SDS、100 μg/mlの変性サケ精子DNA、10%(w/v)デキストラン硫酸を含む5×SSCPに上述のプローブを 1.1×10^6 cpm/mlとなるように添加し、前記フィルターを28°Cで18時間ハイブリダイゼーションさせた。0.1% SDSを含む2

×SSCPを用い、室温で2回フィルターを洗浄し、次いで、0.1 %SDS を含む0.3 ×SSCPを用い、37°Cで3回洗浄した。オートラジオグラフィーを行ったところ、複数のポジティブクローンが検出された。

(2) ポジティブクローンの解析-1

プローブ1とのハイブリダイゼーションで得られたポジティブクローンのうち2つのクローン、λhFL4およびλhFL7から、公知方法(サムブルック J. (Sambrook J.)等、Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, ニューヨーク(New York), 1989年参照)でファージDNA を調製した。クローンλhFL4およびλhFL7中には、それぞれ18kbp、17kbp のヒト染色体DNA を含んでおり、制限酵素マップを作成した結果、互いに重複した範囲を含んでいる事が分かった。

配列表の配列番号25の塩基配列中の524 番目から967 番目に相当するDNA 断片(配列表の配列番号47)を実施例4で得られたプラスミドpTN24-15から調製し、実施例6の方法で³²Pで標識してプローブ3とした。クローンλhFL4とλhFL7を数種の制限酵素で切断した後、上記プローブ3を使用してサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、クローンλhFL4とλhFL7中の2.8kbpのHindIII フラグメントが、当該プローブ3とハイブリダイズすることが確認された。

クローンλhFL4からDNA を調製し、HindIII で消化した。得られた2.8kb のフラグメントを、HindIII で切断したpBluescript KS(+)に組み込み、プラスミドpBL-hFL4H と命名した。pBL-hFL4H 中のDNA 配列をDNA シーケンサー(370A型、パーキンエルマージャパン(株))を使用して解析したところ、当該プラスミドには、ヒト Fasリガンドの細胞外領域のC末端側の130 アミノ酸をコードするDN

A を有するDNA 配列が含まれていることが確認された。結果を、図15と配列表の配列番号26に示した。図15中、5' 末端より数えて12番目まではイントロンである。エクソン部分は13番目のGから始まっており、405 番目から407 番目の配列TAA は終止コドンである。

実施例 5 で解析したpTN24-15の塩基配列と比較し、図15にはヒト Fasリガンドと異なるラット Fasリガンドのアミノ酸残基および塩基のみに下線をつけて示した。ここで配列を確認した部位は、配列番号25の塩基番号514 番目から910 番目の塩基配列と高いホモロジーを有しており、塩基配列で86.7%、アミノ酸で81.5%のホモロジーを有していた。

なお、ハナハンの方法に準じてプラスミドpBL-hFL4H で大腸菌DH10B を形質転換させ、得られた形質転換体、大腸菌DH10B(pBL-hFL4H)を、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託した (FERM P-14014)。さらに、平成 6 年 1 0 月 2 7 日付で、原寄託から国際寄託に移管した (FERM BP-4849)。また、 λ hFL4由来のBamHI フラグメントをpBluescript KS(+) のBamHI サイトに組換えて得たプラスミドpBL-hFL4B1には、ヒトFas リガンド遺伝子のエクソン 3 と上述した130 アミノ酸をコードするエクソン 4 が含まれていることが確認された。

(3) ポジティブクロンの解析- 2

プローブ 2 とのハイブリダイゼーションで得られたポジティブクロンのうち 1 つのクローン λ hFL5 から、同様に、ファージDNA を調製した。このクローン中には18kbp のヒト染色体DNA が含まれていることが確認された。クローン λ hFL5 からDNA を調製し、BamHI で消化した。得られた4.4kbp のフラグメントを、BamHI で切断したpBluescript KS(+) に組み込み、プラスミドpBL-hFL5B1と命名し

た。pBL-hFL5B1中のDNA配列をDNAシーケンサーを使用して解析したところ、当該プラスミドには、ヒトFasリガンドの細胞内領域を含む131アミノ酸をコードするDNAを有するDNA配列が含まれていることが確認された。得られた塩基配列を、pTN24-15の塩基配列と比較し、プロモーター領域、イントロン、エクソンを決定した。また、プラスミドpBL-hFL5B1には、上述した131アミノ酸をコードするエクソン1とともに、エクソン2も含まれていることが確認された。

(2) および(3)で得られた結果をまとめて、図16~18および配列表の配列番号27に示した。図中-----で示した部位は、配列未確認の塩基配列である。ヒトFasリガンドに対する染色体遺伝子は、4つのエクソンよりなる。すべてのスプライシングドナーサイトとアクセプターサイトは、GT----AGルール(パジェット(Padgett)等、Annu. Rev. Biochem., 55巻、1119-1150頁、1986年)に適合しており、スプライシングサイトに隣接する塩基配列は、他の遺伝子に見られるスプライシングサイトの塩基配列とよく一致している。

(実施例12) ヒトFasリガンドをコードするcDNAのクローニングおよび発現

(1) ヒトFasリガンドcDNAのPCRによるクローニング

ヒト末梢血よりT細胞を採取し、10%FCS、50 μ Mの β -メルカプトエタノール、20ng/mlのIL-2を含むRPMI1640培地(日水製薬(株))に、 2×10^6 細胞/mlとなるように懸濁し、37°Cで一晩培養した。次いで、ConAを5 μ g/mlとなるように加え、37°Cでさらに4日間培養した。死細胞をヒストパック1083(シグマ社)を用いた密度勾配遠心で除き、mRNA調製キット(ファルマシア社)を用いてpoly(A)RNAを調製した。カワサキ E. S.等の方法(Kawasaki E. S., Amplification of RNA in PCR Protocols. A Guide to Methods and Amplificat

ions., M. A. イニス(M. A. Innis)等編, アカデミック出版(Academic Press), サンディエゴ(San Diego), 21-27頁、1990年)に従い、以下のように一本鎖cDNAの合成およびPCRを行った。

まず、センスプライマー5 (GCTCTAGACTACAGGACTGAGAAGAAGT) およびアンチセンスプライマー5 (GCTCTAGAACATTCTCGGTGCCTGTAAC)を作製した(配列表の配列番号48および49)。このセンスプライマーは、ATG 開始コドンの上流域と5'末端のXbaIサイト(GCTCTAGA)を含んでいる。一方、アンチセンスプライマーはTAA終始コドンの下流領域とXbaIサイト(GCTCTAGA)を含んでいる。

先述のpoly(A)RNA 1 μ g に、50ngのランダムヘキサマー、200 ユニットのMM LV RNase H⁻ リバーストランスクリプターゼ(ギブコ BRL社)を添加し、逆転写反応させた。この反応液 2.0 μ l を、先述のセンスプライマー、アンチセンスプライマーをそれぞれ100 pmolと 4 \times dNTPとTaq DNA ポリメラーゼを含むPCR バッファー100 μ l で希釈した。DNA サーマル サイ클ラー(DNA thermal cycler、パーキン・エルマー(Perkin-Elmer)社)を使用して、PCRを行った。なお、PCRは; 94 $^{\circ}$ C、1分; 55 $^{\circ}$ C、2分; 72 $^{\circ}$ C、3分を1サイクルとする反応を20サイクル行った。

得られたPCR産物を、制限酵素XbaIで消化した後、1%アガロースゲル(ローゲル テンペレーチャー(Low Gel Temperature)、バイオラッド(BioRad)社)で分離した。約970bpのDNAフラグメントをゲルより回収後、pBluescript IIのXbaIサイトに組み込み、プラスミドpBX-hFL1と命名した。pBX-hFL1中のDNA配列をDNAシーケンサーを使用して確認した。当該プラスミドに含まれる970bpのDNAフラグメントの塩基配列は、実施例11で得られたヒト染色体遺伝子の配列と一

致することが確認された。クローンpBX-hFL1中の塩基配列の解析結果を配列表の配列番号31および図19～20に示す。

ヒト Fasリガンドは、ラット Fasリガンドと同じく、N末端にシグナル配列を持たないが、タンパク分子の中央部分に22個の疎水性アミノ酸を有し、II型膜タンパクであることがわかった。細胞内領域はMet から始まる80アミノ酸からなり、プロリンが80残基中に32含まれる。C末端細胞外領域は179 アミノ酸からなり、3箇所のN-グリコシレーションサイト (Asn-X-Ser/Thr)が存在する。

ハナハンの方法(既出)に準じて、プラスミドpBX-hFL1で大腸菌DH10B を形質転換し、得られた形質転換体、大腸菌DH10B (pBX-hFL1)を工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託し(寄託番号 FERM P-14225)、さらに、平成6年10月27日付で原寄託から国際寄託に移管した(寄託番号 FERM BP-4850)。

(2) COS 細胞への導入

(1) で得られた970bp のXbaI DNAフラグメントを動物細胞発現ベクターpEF-BOS (ミズシマおよびナガタ(Mizushima & Nagata), Nucleic Acids Res., 18巻、5322頁、1990年)のXbaI部位に挿入し、プラスミドpEX-hFL1と命名した。10%FCS を含むD-MEM 培地に、COS-7 細胞を10cmシャーレ当たり 2×10^6 細胞となるように植え込み、5 μ g のプラスミドpEX-hFL1をDEAE-デキストラン法(フクナガ R. (Fukunaga R.)等、Cell, 61巻、341-350頁、1990年)で導入し、形質転換体 COS/pEX-hFL1 を得た。

(3) 形質転換体の細胞障害活性

(2) で形質転換させたCOS 細胞をエフェクター細胞とし、 10^6 のWR19L またはWC8A細胞をターゲット細胞として、実施例8と同様に、組換え細胞の細胞障害

活性を確認した。WC8A細胞は、マウスWR19L 細胞をヒト Fas抗原を発現するように形質転換した細胞である (Itoh N. 等、J. Immunol., 151巻、621-627頁、1993年)。すなわち、 10^6 のWR19L またはWC8A細胞を、 $20\mu\text{Ci}$ の [^{51}Cr] クロム酸ナトリウム(アマーシャム(Amersham)社)を含むRPMI1640培地で、 37°C で2時間培養し、 ^{51}Cr で標識した。

この ^{51}Cr で標識した細胞 (1×10^4) を、COS/pEX-hFL1 と様々な割合で混合し、 37°C で4時間培養後、 ^{51}Cr の遊離を指標に細胞障害活性を測定した。この結果を図21に示す。

図21に示すように COS/pEX-hFL1 はWC8A細胞に対しを濃度依存的に細胞障害活性を示した。WR19L に対してはアポトーシスは誘導しなかった。さらに、COS/pEX-hFL1 の細胞障害活性を調べた結果を図22に示す。この細胞障害活性は、実施例1で作製したヒト Fas抗原の細胞外領域を含むキメラ蛋白質 (hFas-Fc) あるいはマウス Fas抗原の細胞外領域を含むキメラ蛋白質 (mFas-Fc) を添加することにより阻害されたが、可溶型のヒトTNF レセプター(hTNFR β -Fc) を添加しても阻害されなかった (図22)。

以上の結果より、(1) で単離した970bp のcDNAによりコードされる蛋白質は、Fas抗原と結合してアポトーシスを誘導する活性を有する Fasリガンドであることが確認された。

(実施例13) マウス Fasリガンド染色体遺伝子の単離

129 /Sv マウス染色体DNA を λ FIX IIベクターに導入して作成したマウス染色体DNA ライブラリー (ストラタジーン (Stratagene) 社、ラホヤ(La Jolla), CA)) を指示菌に感染させ、軟寒天と混合し、寒天プレートに重層し、 1.3×10^6

個のブランクを得た。これを一旦 4℃で約 4 時間冷却し、ファージをニトロセルロースフィルターに転写した。

実施例11で得たプラスミドpTN24-15を鋳型として、センスプライマー 4 (AGAAC TCCGTGAGTTCACCA)およびアンチセンスプライマー 4 (CAATATTCCTGGCATCCATG)配列を用いてPCR を行い、細胞外ドメインをコードするcDNA (配列表の配列番号25の塩基配列の塩基番号400 から967 番)を増幅させた。ランダムプライマーラベリングキット (ベーリンガーマンハイム社) を使用して実施例 6 の方法で増幅産物を³²P 標識して、プローブ 1 を作製した。また、配列表の配列番号25の5' 末端側、すなわち配列表の配列番号25の塩基番号43から233 をPCR により増幅させ、上述のように³²P 標識して、プローブ 2 を作製した。

プローブ 1 および 2 をそれぞれ、ニトロセルロースフィルターとハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーションの条件は後述する実施例16と同様の穏やかな条件で行った。すなわち33℃で18時間ハイブリダイゼーションした後、フィルターを室温にて0.1 %SDS を含む 2 ×SSCPで 2 回洗浄した後、37℃の0.1 %SDS を含む0.3 ×SSCPで洗浄した。オートラジオグラフィーを行ったところ、2つのポジティブクローンを得た (λMFL5, λMFL18)。ポジティブクローンのブランクを単離し、pBluescript II KS(+) (ストラタジーン(Stratagene)社) にサブクローニングした後、挿入されているマウス染色体DNA の制限酵素地図の作成、DNA シーケンサーを使用して塩基配列を決定した。

この 2 クローンについて制限酵素地図を作成し、サザンハイブリダイゼーション解析したところ、λMFL5, λMFL18 は、それぞれ Fasリガンド染色体遺伝子の 5'、3' 領域を有していた。また、ラット FasリガンドcDNAと相応する領域、プロ

モーター領域の塩基配列を決定したところ、決定された塩基配列は、ラット Fas リガンドcDNAと高い相同性を示し、クローニングされた λ FIX IIベクターに組み込んだ DNAがマウス Fasリガンド遺伝子を含むことがわかった。

図23～24に、マウス Fasリガンド遺伝子のプロモーター、エクソン、3' フランキング領域の塩基配列を示した。TATA boxから107bp 下流のATG開始コドンから837bp のオープンリーディングフレームがあり、279 アミノ酸（アミノ酸部分の分子量31,440）をコードしている。マウス Fasリガンドは、ラット Fasリガンドと同様N末端にシグナル配列を持たないが、タンパク分子の中央部分に22疎水性アミノ酸を有していた。これにより、マウス FasリガンドはII型膜タンパクであることが明らかになった。細胞内領域は78アミノ酸からなりプロリンが78残基中25含まれる。C末端細胞外領域は179 アミノ酸からなり、5箇所のN-グリコシレーションサイト（Asn-X-Ser /Thr）が存在する。

また、マウス FasリガンドcDNAは、ラット FasリガンドcDNAと塩基配列で90.6%、アミノ酸配列で91.4%の相同性をもち、3' ノンコーディング領域で84.5%の相同性を持つことが確認された。

（実施例14）マウス FasリガンドをコードするcDNAのPCR によるクローニングおよび発現

（1）プラスミドpBL-MFLW4 の調製

野生型（C3H +/+）マウスの脾臓細胞を、10%FCS、50 μ Mの β -メルカプトエタノール、1.5 μ g/mlのConA、20ng/ml のIL-2を含むRPMI1640培地（日水製薬（株））に、 2×10^6 細胞/ml となるように懸濁し、37°Cで2日間培養した。10ng/ml のPMA、500ng /ml のイオノマイシンで4時間処理した後、死細胞をヒ

ストバック1083（シグマ社）を用いた密度勾配遠心で除き、mRNA調製キット（ファルマシア社）を用いてpoly(A)RNAを調製した。

カワサキ(Kawasaki)等の方法 (Kawasaki E. S., Amplification of RNA In PCR Protocols. A Guide to Methods and Amplifications., M. A. イニス(M. A. Innis) 編、アカデミック出版(Academic Press), サンディエゴ(San Diego)、21-27 頁、1990年) に従い、以下のように一本鎖cDNAの合成およびPCR を行った。

まず、センスプライマー 6 (GCTCTAGAGAGAAGGAAACCCTTTCCTG) およびアンチセンスプライマー 6 (GCTCTAGAATATTCCTGGTGCCCATGAT) を作製した (配列表の配列番号50および51)。このセンスプライマー 6 は、ATG 開始コドンの上流域と5' 末端のXbaIのサイト (GCTCTAGA) を含んでいる。一方、アンチセンスプライマーはTAA 終始コドンの下流領域とXbaIサイト (GCTCTAGA) を含んでいる。

先述のpoly(A)RNA 1 μ g に、50ngのランダムヘキサマー、200 ユニットのMM LV RNase H⁻ リバーストランスクリプターゼ (ギブコBRL(Gibco BRL)社) を添加し逆転写反応させた。この反応液 1.0 μ l を、先述のセンスプライマー、アンチセンスプライマーをそれぞれ100pmol、4 \times dNTPとTaq DNA ポリメラーゼを含むPCR バッファー 100 μ l で希釈した。DNA サーマル サイ클ラー (DNA thermal cycler、パーキン・エルマー (Perkin-Elmer) 社) を使用して、PCR 産物を制限酵素XbaIで処理した後、1%アガロースゲル (ロー ゲル テンペレーチャー (Low Gel Temperature)、バイオラッド社) で分離した。

約940bp のDNA フラグメントをゲルより回収後、pBluescript II KS(+)のXbaI サイトに組み込み、プラスミドpBL-MFLW4 と命名した。pBL-MFLW4 中のDNA 配列

をDNA シーケンサーを使用して確認した。その結果、pBL-MFLW4 は、配列表の配列番号32の塩基配列を有しており、当該塩基配列は、実施例13で得られた染色体遺伝子の配列と一致することが確認された。

ハナハンの方法（既出）に準じて、プラスミドpBL-MFLW4 で大腸菌DH10B を形質転換し、得られた形質転換体、大腸菌DH10B (pBL-MFLW4) を工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託した（寄託番号 FERM P-14226）。さらに、平成6年10月27日付で原寄託から国際寄託に移管した（FERM BP-4851）。

（2）COS 細胞への導入

（1）で得られた940bp のXbaIフラグメントを動物細胞発現ベクターpEF-BOS（ミズシマ及びナガタ(Mizushima & Nagata), 1990年）のXbaI部位に挿入し、プラスミドpEF-MFLW4Fと命名した。COS-7 細胞を10%FCS を含むD-MEM 培地に、10cmシャーレ当たり 2×10^6 細胞となるように植え込み、5 μ g のプラスミドpEF-MFLW4FをDEAE-デキストラン法（フクナガ(Fukunaga), 1990年）で導入した。

（3）形質転換体の細胞障害活性

（2）で形質転換させたCOS 細胞（COS/pEF-MFLW4F）をエフェクター細胞とし、 10^6 のWR19L またはW4細胞をターゲット細胞として、実施例8と同様に、組換え細胞の細胞障害活性を確認した。W4細胞はマウスWR19L 細胞をマウス Fas抗原を発現するように形質転換した細胞である（オガサワラ J. (Ogasawara J.) 等, Nature, 364 巻, 806-809 頁, 1993年）。すなわち、 10^6 のWR19L 細胞またはW4細胞を、20 μ Ciの [^{51}Cr] クロム酸ナトリウム（アマーシャム(Amersham)社)を含むRPMI1640培地を用いて37°Cで2時間培養し、 ^{51}Cr で標識した。

この ^{51}Cr で標識した細胞（ 1×10^4 ）を、COS/pEF-MFLW4F 細胞と様々な割合

で混合し、37°Cで4時間培養後、 ^{51}Cr の遊離を指標に細胞障害活性を測定し、結果を図25に示した。

図25に示すように COS/pEF-MFLW4F 細胞はW4細胞を濃度依存的に細胞障害活性を示したが、WR19L 細胞に対してはアポトーシスを誘導しなかった。また、図21に示したように、WC8A細胞に対しても、濃度依存的に細胞障害活性を示した。さらに、COS/pEF-MFLW4F 細胞の細胞障害活性は、実施例1で作製したマウス Fas 抗原の細胞外領域を含むキメラ蛋白質 (mFas-Fc) 20 $\mu\text{g/ml}$ を添加することにより阻害されたが、ヒトTNF レセプターの可溶型 (hTNFR β -Fc) では阻害されなかった。

以上の結果より、(1)で単離した940bp のcDNAによりコードされる蛋白質は、Fas抗原と結合してアポトーシスを誘導する活性を有する Fasリガンドであることが確認された。

(実施例15) モノクローナル抗体の作製

(1) ペプチドの合成及びキャリアー結合投与抗原の調製

実施例12で決定したアミノ酸配列に基づき4種類のペプチドを合成した。配列表の配列番号52に示すペプチド①(LVMMEGKMMSY)はFmoc法を用いたペプチド合成キット(国産化学(株))の使用説明書に従って合成し、樹脂から脱保護切断した後エーテルにより粗ペプチド275.7mgを得た。次に粗ペプチド10mgを5%アンモニア水溶液を用いて溶解し、セファデックスG10により脱塩した。

得られた溶液を逆相HPLCカラム カプセルパックC18(CAPCELLPAK C18 120Å、5 μm 、4.6mm×250mm、資生堂(株))を用いて精製した。溶出液を

凍結乾燥し、精製ペプチドを得た。

また、ペプチド② (KSNSRSMPLEWEDTYGIVLL)、ペプチド③ (SKYPQDLVMMEGKMMS) およびペプチド④ (LSLVNFEE SQTFF) は (株) 不二家バイオサイエンス研究所に合成を依頼した (配列表の配列番号53~55)。

得られたペプチドを以下の方法でキーホールリンペットヘモシアニン (KLH: ピアス(Pierce)社) およびカチオン化BSA (ピアス社) に結合し投与抗原とした。

KLH およびカチオン化BSA は蒸留水に溶解し10mg/ml に調製した。各々のペプチドを蒸留水または5%アンモニア水に溶解し1mg/ml に調製した。KLH ではペプチドとキャリアーのモル比が100対1となるように、カチオン化BSA では10対1となるようにそれぞれ混合し、塩酸を用いてpH5に調整した。次に水溶性カルボジイミド (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride、同仁化学研究所) をキャリアー1mg当たり等量添加し、室温にて4時間攪拌した。反応液をセファデックスG25 (ファルマシア社) により精製し、最初に溶出してくる画分を投与抗原とした。

(2) 投与および抗血清の調製

(1) で調製した投与抗原100 μ g と等量のフロインド完全アジュバントとを混合し、BALB/cまたはddy マウス (5~6週令、♀) の腹腔内に投与した。1週間後、同量をフロインド不完全アジュバントと混合し、腹腔内に投与した。さらに1週間間隔で2回追加投与を行い、さらに1週間後に投与抗原20 μ g を生理食塩水で希釈し、静脈内投与し、2日後に細胞融合を行った。2回投与後、抗血清

を眼底静脈より採血し、血清を分離して得た。

(3) 抗血清のペプチドとの反応性の測定

アミノプレート（住友ベークライト（株））の各ウェルに2.5 %のグルタルアルデヒド溶液70 μ l を分注し、室温で1時間静置し、内容液を廃棄した。0.076 MのPBS(pH6.4) で5 μ g/mlに希釈したペプチド溶液50 μ l を加え、37°Cで1時間処理した。プレートを氷水で冷却後、イオン交換水でプレートを5回洗浄し、0.2 %のゼラチンを溶解したPBS 100 μ l を分注し、30分静置しブロッキングを行った。

次に抗血清をPBS で500 倍に希釈し50 μ l 添加した。37°Cで1時間反応後、0.005 % Tween 20 を含む生理食塩水（以下、洗浄液と略す）で2回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗マウスイムノグロブリン抗体（ダコ(DAKO)社）を0.25%のゼラチンを溶解したPBS で2,000 倍に希釈して添加した。37°Cで1時間反応させた後、洗浄液で5回洗浄した。オルトフェニレンジアミンを3 mg/ml、過酸化水素を0.027 %を含むマッキルベイン緩衝液pH5.0 を50 μ l を添加し室温で10分間反応させた。

反応後、2 N硫酸50 μ l を添加し反応を停止し、492nm の吸光度を測定した。各抗血清とも投与したペプチドと反応性を示した。

(4) モノクローナル抗体の作製

(2) で免疫したマウスを屠殺し、脾臓を取り出した。これを細断した後、ステンレス・メッシュを通し、RPMI1640培地に浮遊させ、脾細胞浮遊液を得た。この脾細胞とマウスミエローマ細胞（P3X63Ag8U1）を10 : 1 の割合で混合して遠心（1,400rpmで8分間）した。得られた沈殿に0.5ml の42.5%のポリエチレングリ

コール1540と15%のジメチルスルフォキサイドを含むRPMI1640をすばやく加え、さらに1分間激しく細胞を振とうした後、10mlのRPMI1640をゆっくり加えた後、遠心（800rpmで5分間）を行った。

この沈殿をHAT 培地（ヒポキサンチン 1×10^{-4} M、アミノプテリン 4×10^{-7} M、チミジン 1.6×10^{-5} M、10%FCS を含むRPMI1640培地）に 2×10^5 細胞/ml になるように懸濁し、96ウェルマイクロプレートのウェル当り0.2ml を分注した。2～3日毎に半量の培地を交換し、その後HT培地（ヒポキサンチン 1×10^{-4} M、チミジン 1.6×10^{-5} M、10%FCS を含むRPMI1640培地）に交換した。

ハイブリドーマ細胞の生育が認められたところで、ELISA 法によりスクリーニングを行った。すなわち、実施例15（1）で作製したペプチドを不溶化させた96ウェルプレート洗浄液で2回洗浄後、0.25%ゼラチンを含むPBS で10倍に希釈した培養上清100 μ lを各ウェルに添加し、室温で2時間反応させた。反応終了後、洗浄液で5回洗浄し、第2抗体として0.25%ゼラチンを含むPBS で2,000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスIgG抗体（ダコ(DAKO)社）50 μ lを添加し、室温で2時間反応させた。

反応終了後、洗浄液で5回洗浄後、3mg/ml オルトフェニレンジアミンおよび0.027%過酸化水素を含む0.1 Mマッキルベイン緩衝液pH5.0 を100 μ l添加し、室温で10分間酵素反応を行い、100 μ lの2N硫酸で反応を停止し、492nmの吸光度を測定した。

ELISA 法で陽性であったウェルのハイブリドーマを、96ウェルマイクロプレートに1ウェルあたり2個、1個、あるいは0.5個となるよう10%FCS を含むRPMI

1640を用いて希釈した。

ウイスターラットの胸腺細胞をフィーダー細胞として加えて、プレートの各ウェルに植え込み、クローニングを行った。

顕微鏡下で観察して、確実にシングルセルコロニーであるウェルを選択し、それらの培養上清を(3)のELISA法によりスクリーニングし、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得た。

(5) ウェスタンブロッティングによる反応性の確認

前記(2)で得られた抗血清(ペプチド②を使用して作成した抗原で免疫、lot. 19-3)および前記(4)で得られたモノクローナル抗体(ペプチド②を使用して作成した抗原で免疫、F864-5-1)とヒトFasリガンドとの反応性を、実施例12でCOS細胞に発現させたヒトFasリガンド、実施例14で発現させたマウスFasリガンドおよびFasリガンドの配列を含まないベクターをトランスフェクトしたCOS細胞をコントロールとしてウェスタンブロッティングで確認した。

まず、各組換えCOS細胞約 1×10^4 個を150mMのNaCl、1%のNP-40、0.1%デオキシコール酸ナトリウム(Sodium deoxycolate)、0.1%SDSおよび0.2U/mlのアプロチニン(Aprotinin)を含む50mM Tris-HCl (pH7.5) 9 μ lと混合し、さらに等量の2%SDS、30%グリセロール、10%の2-メルカプトエタノールおよび0.01%BPBを含む0.25M Tris-HCl (pH6.8)と混合した。

37°Cで1時間処理した後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(4-20%グラジエントゲル)を行い、泳動終了後PVDF膜(ミリポア社)に4°Cにて200mA、90分の条件で転写した。メンブレンをブロックエース(雪印乳業(株))で、37°Cで2時間ブロッキングを行った。

次にメンブレンを洗浄液で2回、37°Cで4分攪拌して洗浄し、PBSで5倍に希釈したブロックエースで500倍に希釈した抗血清19-3、または培養上清F864-5-1と37°Cで1.5時間反応させた。反応終了後、洗浄液で2回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスイムノグロブリン抗体 (Cat.No. P260、ダコ社) をPBSで5倍に希釈したブロックエースで1,000倍に希釈した溶液に浸し、37°Cで1.5時間反応させた。メンブレンを洗浄液で3回、蒸留水で2回洗浄し、表面の水を切りTMB試薬 (Cat.No. TM9125、シツク (SCYTK)社) で発色させた。

図27及び28に、抗血清19-3とモノクローナル抗体F864-5-1を使用したウエスタンブロッティングの結果をそれぞれ示した。図27及び28から明らかなように、ヒトFasリガンド発現COS細胞抽出液と反応するバンドが見られるのに対して、マウスFasリガンドおよびコントロールではバンドは認められなかった。

(6) 阻止反応によるペプチドとの反応性の確認-1

前記(4)で得られたモノクローナル抗体(ペプチド②)を使用して作製した抗原で免疫、F883-1-1)と、投与抗原ペプチド(ペプチド②)との反応性を阻止反応により確認した。

アミノプレート(住友ベークライト(株))の各ウェルに2.5%のグルタルアルデヒド溶液70 μ lを分注し、室温で1時間静置後、内容液を廃棄した。0.076MのPBS(pH6.4)で5 μ g/mlに希釈したペプチド②溶液50 μ lを加え、37°Cで1時間処理した。プレートを氷水で冷却後、イオン交換水でプレートを5回洗浄し、0.2%のゼラチンおよび0.1Mグリシンを含むPBS 100 μ lを分注し、30分間静置してブロッキングを行った。

次に、阻止ペプチドとして上記ペプチド②、③、④をPBSで10 μ g/mlに希釈し

て阻止抗原溶液とし、ネガティブコントロールとして阻止抗原を含まない溶液を調製した。これらの各溶液をそれぞれ25 μ l添加後、0.2 %ゼラチンを溶解したPBSを用いて0.4 μ g/mlに希釈したF883-1-1を25 μ l加えた。37°Cで1時間反応後、洗浄液で2回洗浄した。

次に、ペルオキシダーゼ標識抗マウスイムノグロブリン抗体（ダコ社）を0.2 %のゼラチンを溶解したPBSで2,000倍に希釈して各ウェルに50 μ lを添加した。37°Cで1時間反応させた後、洗浄液で5回洗浄した。オルトフェニレンジアミンを3 mg/ml、過酸化水素を0.027 %含むマッキルベイン緩衝液pH5.0を上記各ウェルに50 μ l添加して室温で10分間反応させた。2 N硫酸50 μ lを添加して反応を停止し、492nmの吸光度を測定した。結果を図29に示した。

図29では、阻止抗原無添加のウェル（ネガティブコントロール）の吸光度を100とした場合の各ウェルの吸光度を算出し、反応性として示した。

図29から明らかなように、F883-1-1抗体と抗原ペプチドとの反応性は、阻止ペプチドとしてペプチド②を使用した場合にのみ阻止されることが確認された。

（7）阻止反応によるペプチドとの反応性の確認－2

前記（4）で得られたIgM型モノクローナル抗体（ペプチド③を使用して作製した抗原で免疫したマウスより得た脾細胞とミエローマから作成したハイブリドーマF897-1-2の産生する抗体F897-1-2）と、投与抗原ペプチド（ペプチド③）との反応性を阻止反応により確認した。

まず、中根ら（Immunofluorescence and Related Staining Techniques, W. Knapp, K. Holubar and G. Wick eds. 1978）の方法に従い、ペプチド③をペルオキシダーゼで標識した。すなわち、ペルオキシダーゼ（RZ3.11、東洋紡（株））を

6 mg秤量し、1.5 ml の蒸留水で溶解した。次に蒸留水で溶解した0.1 Mメタ過ヨウ素酸ナトリウムを0.3 ml 添加し室温で15分間静置し、続いて蒸留水で溶解した1.5 %エチレングリコール0.3 mlを添加し室温で20分間静置した。この溶液を0.001 Mの酢酸緩衝液(pH4.4) に対して4℃で一夜透析した。

得られた活性化ペルオキシダーゼ159 μ l (ペルオキシダーゼ500 μ g 相当) に1 M炭酸緩衝液(pH9.5) を9 μ l 添加し、続けて蒸留水で溶解して1 mg/ml に調製したペプチド③を428 μ l (ペルオキシダーゼに対して20倍モル量) 添加し25℃にて2時間反応させた。次に、0.01 M炭酸緩衝液(pH9.5) で溶解した4 mg/ml の水素化ホウ素ナトリウムを15 μ l 添加し4℃で2時間静置し、さらに蒸留水で0.2 Mに希釈したグリシンを25 μ l 添加し室温で1時間静置した。次に0.076 MのPBS(pH6.4)に対して4℃で一夜透析し、得られたペルオキシダーゼ標識ペプチド③溶液に等量のグリセロールを添加し-20℃にて保存した。

次に、イムノプレート(ヌンク(NUNC)社、マキシソープ(MaxiSorp™))の各ウェルに0.076 MのPBS(pH6.4)で20 μ g/mlに希釈した抗マウスイムノグロブリン抗体(Z259、ダコ社)を50 μ l 加え、45℃で30分処理した。プレートを氷水で冷却後、イオン交換水でプレートを5回洗浄し、0.2 %ゼラチンを含むPBS 100 μ l を分注し、4℃で一夜静置してブロッキングを行った。ブロッキング後、PBSで100 倍に希釈した塩析抗体(F897-1-2)を50 μ l 加え37℃で1時間静置した後、0.005 % Tween 20 を含む0.9 %NaClの洗浄液で2回洗浄し、さらにイオン交換水で1回洗浄した。

一方、ペプチド③をPBS で3 μ g/ml、10 μ g/mlに希釈して阻止抗原溶液とし、ネガティブコントロールとして阻止抗原を含まない溶液を調製した。これらの溶

液を25 μ l 添加後、PBS で200 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ペプチド③を25 μ l 加え、37°Cで1 時間反応させた。反応終了後洗浄液で5 回洗浄し、続いてイオン交換水で2 回洗浄した。オルトフェニレンジアミンを3 mg/ml 、過酸化水素0.027 %を含むマッキルペイン緩衝液(pH5.0) を上記各ウェルに50 μ l 添加して室温で5 分間反応させた。2 N硫酸50 μ l を添加して反応を停止し、492 nmの吸光度を測定した。阻止抗原無添加のウェル（ネガティブコントロール）の吸光度を100 とした場合の各ウェルの吸光度を算出し、反応性（%）とした。結果を図31に示した。

図31から明らかなように、F897-1-2抗体と抗原ペプチドとの反応性は、ペプチド③により阻止されることが確認された。

（実施例16）アポトーシス抑制活性の評価－1

実施例15で得られた抗体F883-1-1のアポトーシス抑制活性を、Fasリガンドを発現する形質転換体およびFas抗原を発現する形質転換体を使用した以下の方法で確認した。

まず、ヒトFasリガンドをコードするcDNAを含むプラスミドpEX-hFL1（実施例12参照）で、マウス正常骨髓細胞由来細胞株FDC-P1を形質転換した。その中の1 クローン、FLh1細胞を、50U/ml のマウスIL-3（インタージェン社）および10%のFCS を含有するRPMI1640培地（ギブコ BRL社）中で、5 %CO₂ 存在下、37°Cにて4 日間培養した。培養後、FLh1細胞を10%FCS を含有するRPMI1640培地に5 \times 10⁵ 細胞/ml となるよう懸濁し、この懸濁液を96穴平底プレートの各ウェルに50 μ l ずつ添加した。

一方、実施例15で得られた抗体F883-1-1をPBS - を使用して各種濃度に調製し

た。これを上述の各ウェルに10 μ lずつ添加し、5%CO₂ 存在下、37°Cにて30分間インキュベートした。

次に、10%FCS を含有するRPMI1640培地に、ヒト Fas抗原を発現する形質転換体WC8 細胞（イトウ N. (Itoh N.)等、J. Immunol., 151 巻、621-627 頁、1993年）を6.3 $\times 10^5$ 細胞/ml となるよう懸濁し、これを各ウェルに40 μ lずつ添加した。5%CO₂ 存在下、37°Cで16時間インキュベートした後、トリパンブルーを各ウェルに100 μ lずつ添加して、各ウェルあたりの生細胞数をカウントした。

F883-1-1抗体のアポトーシス抑制活性を図30に示した。図30から明らかなように、FLh1によるWC8 のアポトーシスはF883-1-1抗体により用量依存的に抑制された。なお、モノクローナル抗体F883-1-1を産生するハイブリドーマF883-1-1を、平成6年8月9日付で工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託し（寄託番号 FERM P-14464）、さらに平成6年10月27日付で原寄託から国際寄託に移管した（FERM BP-4852）。

（実施例17）アポトーシス抑制活性の評価－2

実施例15で得られた抗体F897-1-2のアポトーシス抑制活性を、以下に述べる実施例18（3）の方法で作製した形質転換体COS-1 /pEX-hFL1 の培養上清およびヒト Fas抗原を発現する形質転換体 WC8細胞を使用して、実施例8および12の方法に準じて確認した。

まず、10⁶ 個のWC8 細胞を20 μ Ciの [⁵¹Cr] クロム酸ナトリウム（NEN 社）および10%の非働化ウシ血清を含有するRPMI1640培地中で37°Cで2時間培養し、⁵¹Crで標識した。

次に、96ウェルU底プレート（コーニング(CORNING) 社）の各ウェルに、COS-1 /pEX-hFL1 の培養上清を終濃度が3%になるように6 μ l、10%のFCS を含有するRPMI1640を74 μ l ずつ添加した。さらに、実施例15で得られた抗体F897-1-2を、0.1 %のBSA を含有するPBS - で300 μ g/mlになるように調整し、終濃度が30 μ g/mlとなるように各ウェルに20 μ l ずつ添加した。37°Cで30分間インキュベートした後、 51 Crで標識した WC8細胞を 1×10^4 個/100 μ l / ウェルとなるよう各ウェルに添加し、37°Cで4時間培養した。培養後、 51 Crの遊離を指標に細胞障害活性を測定した。

結果を図32に示した。図32より明らかなように、COS-1 /pEX-hFL1 の培養上清中に存在する Fasリガンドによる WC8細胞のアポトーシスは、F897-1-2抗体により抑制された。

なお、モノクローナル抗体であるF897-1-2抗体を産生するハイブリドーマF897-1-2を、工業技術院生命工学工業技術研究所に、平成6年9月1日付けで寄託し（寄託番号 FERM P-14497）、さらに平成6年10月27日付で原寄託から国際寄託に移管した（FERM BP-4853）。

（実施例18）ヒト Fasリガンドの細胞外領域の発現

（1）プラスミドpM1067の作製

まず、センスプライマー7 (CACCTGCAGAAGGAGCTGGCAGAA)およびアンチセンスプライマー7 (AATAAGCTTGGTACCCTATTAGAGCTTATATAA) を化学合成機にて合成した（配列表の配列番号56および57）。このセンスプライマーはヒト Fasリガンド細胞外領域、すなわち前記式3のアミノ酸配列のN末端側に位置するアミノ酸配列をコードする塩基配列とPstIサイト (CTGCAG) を含んでいる。また、アンチセンス

プライマーは、TAA終止コドンを含む領域とHindIII サイト (AAGCTT)、KpnI サイト (GGTACC) を含んでいる。

得られたセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーをそれぞれ 100pmol、実施例12(1)で得たプラスミドpBX-hFL1を50ng、dATP、dCTP、dGTP、dTTPをそれぞれ20nmol、2.5 ユニットのpfu ポリメラーゼおよび添付のpfu バッファー (共にストラタジーン社) 10 μ l を含む100 μ l の溶液を調整した。DNA サーマルサイクラー (PCR システム9600, パーキンエルマー社) を使用して; 94°Cで30秒; 55°Cで30秒; 72°Cで1分を1サイクルとするPCR を30サイクル行った。得られたPCR 産物をPstI、HindIII で二重消化し、pUC118のPstI、HindIII サイトに組み込み、得られたプラスミドをpM1067と命名した。

(2) プラスミドpM1070の作製

センスプライマー 8 (TGCGAATTCACCATGCTGGGCATCTGG) およびアンチセンスプライマー 8 (AACCTGCAGGTGGAAGAGCTGAGCAACAGACGTAAG)を化学合成機にて合成した (配列表の配列番号58および59)。このセンスプライマー 8はヒト Fas抗原シグナルペプチドをコードする配列の5' 末端領域とEcoRI サイト(GAATTC)を含んでいる。一方、アンチセンスプライマー 8はヒト Fas抗原シグナルペプチドをコードする配列の3' 末端領域とヒト Fasリガンド細胞外領域のN末端側をコードする塩基配列およびPstIサイトを含んでいる。

得られたセンスプライマー 8、アンチセンスプライマー 8をそれぞれ 100pmol、実施例1(3)で使用したプラスミドpBLF58-1を50ng、dATP、dCTP、dGTP、dTTPをそれぞれ20nmol、2.5 ユニットのpfu ポリメラーゼおよび添付のpfu バッファー (共にストラタジーン社) 10 μ l を含む 100 μ l の溶液を調整し、

(1)と同様にPCRを行った。

得られたPCR産物をEcoRI、PstIで二重消化し、(1)で得たプラスミドpM1067のEcoRI、PstIサイトに組み込み、pM1250を得た。さらに、これをEcoRI、KpnIで二重消化し、アガロースゲル電気泳動に供した。約600bpの断片を回収し、キアエックス(QIAEX™)キット(キアジェン(QIAGEN)社)を使用して、DNAを精製した。実施例14(2)で使用したpEF-BOSにDHFR遺伝子を組換えたプラスミドpM1103を準備し、そのクローニングサイトのEcoRI、KpnIサイトに、上述の約600bpのDNA断片を組み込み、得られたプラスミドをpM1070と命名した。

(3) COS細胞への導入

pM1070および実施例12(1)で作製したpEX-hFL1を各々COS-1細胞へ導入し、形質転換体COS-1/pM1070およびCOS-1/pEX-hFL1を作製した。すなわち、8.1 μgのpM1070あるいはpEX-hFL1を40 μlの10mM Tris-HCl(pH7.4)/1mMエチレンジアミン四酢酸(以下、TEバッファーと記す)溶液に溶解した。これらに、それぞれ、0.2mg/ml DEAE-デキストランおよび50mM Tris-HCl(pH7.4)を含有するD-MEM(日水製薬(株))11.3mlを添加し、DNA-DEAEデキストラン混合液を作製した。

150cm²のルーフラスコ内でセミコンフルエントまで単層培養したCOS-1細胞にDNA-DEAEデキストラン混合液を滴下し、5%CO₂存在下で、37°Cにて培養し、形質転換体COS-1/pM1070およびCOS-1/pEX-hFL1を得た。4時間後、DNA-DEAEデキストラン混合液を除去し、10%FC(アーバンサイエンティフィック社)を含有するD-MEMに交換し、さらに48~96時間培養した。COS-1/pM1070およびCOS-1/pEX-hF

L1の培養上清を回収し、以下の（４）および（５）で使用した。

（４）細胞障害活性の確認

（３）で得た培養上清の細胞障害活性を、WC8細胞あるいはW4細胞をターゲット細胞として、実施例 8 および実施例12と同様に測定した。すなわち、 10^6 個のWC8細胞あるいはW4細胞を、 $20 \mu\text{Ci}$ の ^{51}Cr クロム酸ナトリウム（NEN 社）を含むRPMI1640培地を用いて 37°C で2時間培養し、 ^{51}Cr で標識した。

^{51}Cr で標識した細胞を 1×10^4 個含む反応液中に、（３）で得た細胞培養上清を終濃度3%あるいは10%となるように添加し、 37°C で4時間培養後、 ^{51}Cr の遊離を指標に細胞障害活性を測定した。結果を図33および34に示した。図から明らかなように、COS-1/pM1070およびCOS-1/pEX-hFL1の培養上清は、WC8細胞あるいはW4細胞に対して濃度依存的に細胞障害活性を示した。図中、Mockは、コントロール（対照）を示す。

以上の結果より、これらの培養上清中には、Fas抗原と結合してアポトーシスを誘導する活性を有するFasリガンドが含まれていることが確認された。

（５）形質転換体COS-1/pM1070およびCOS-1/pEX-hFL1の培養上清を使用したウェスタンブロッティング

ヒト Fasリガンドのアミノ酸配列の一部（PSPPEKKELRKVAH、配列表の配列番号60）を認識するウサギ抗血清を公知方法に従って作製し、以下の方法でウェスタンブロッティングを行った。

まず、（３）で得た形質転換体COS-1/pM1070およびCOS-1/pEX-hFL1の培養上清 $10 \mu\text{l}$ をそれぞれ蒸留水 $5 \mu\text{l}$ とを混合した。これらに、4%SDS、80%グリセロール、0.04%BPBを含む蒸留水 $5 \mu\text{l}$ もしくは4%SDS、80%グリセロール、

8 %DTT、0.04%BPB を含む蒸留水 5 μ l を加え、それぞれ37°Cで1時間処理した後、SDS-PAGE (5-20%グラジエントゲル)を行った。泳動終了後、PVDF膜 (アトー社) に室温にて200mA、60分の条件で転写した。スキムミルク (雪印乳業 (株)) を使用して4°C、一夜反応させ、ブロッキングを行ったのち、メンブレンをPBS で1回 (室温で15分インキュベート)、0.1 %Tween 20/PBSで2回 (室温で5分インキュベート) 洗浄した。

上述のウサギ抗血清を0.5% BSA/0.1% Tween 20/PBSで1,000 倍に希釈し、37°Cで1時間反応させた。反応終了後、0.1% Tween 20/PBS で2回洗浄した。洗浄後、さらに、0.5% BSA/0.1% Tween 20/PBSで1,000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ウサギイムノグロブリン抗体 (Cat.No. P448、ダコ社) 溶液に浸し、室温で1時間反応させた。メンブレンを0.1 %Tween 20/PBSで5回洗浄し、表面の水を切り、ECL システム (アマーシャム社) で検出した。

その結果、COS-1/pM1070の培養上清では、還元条件下で29kD付近に、非還元条件下で26kD付近に、それぞれバンドが認められた。

一方、COS-1/pEX-hFL1の培養上清では、還元条件下で26kD付近に、非還元条件下で24kD付近にそれぞれバンドが検出された。

非還元条件下でのウェスタンブロットの結果をそれぞれ図35および36に示した。図中、Mockは、図33および34と同じである。

(実施例19) アンチセンスオリゴヌクレオチドによる Fasリガンドの発現抑制

(1) アンチセンスオリゴヌクレオチドの合成

配列表の配列番号31の20番目から41番目の塩基配列 (TAAACCGTTTGCTGGGGCTGG) をもつ22塩基よりなるフォスフォロチオエート型センスオリゴヌクレオチド (以

下、センスオリゴヌクレオチドS20と呼ぶ) およびそれに相補的な塩基配列 (CCAGCCCCAGCAAACGGTTT) をもつフォスフォロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチド (以下、アンチセンスオリゴヌクレオチドA41と呼ぶ) を公知方法にて合成した (配列表の配列番号61および62)。得られた合成オリゴヌクレオチドを1mMとなるようにTEバッファーに溶解した。

(2) アンチセンスオリゴヌクレオチドの細胞への導入

ヒト Fasリガンドを発現する形質転換体FLh1細胞 (実施例16参照) を10%の非動化FCSを含むRPMI1640培地に懸濁し、 2.0×10^4 個/196 μ l/ウェルとなるように96ウェルプレート (マックス社) の各ウェルに添加した。(1) で得た1mMのアンチセンスオリゴヌクレオチドA41を、終濃度20 μ Mとなるように4 μ lずつ各ウェルに添加し、5%CO₂ 存在下で3日間培養し、細胞にオリゴヌクレオチドを導入した。同様に、1mMのセンスオリゴヌクレオチドS20あるいはTEバッファーをそれぞれ4 μ lずつ各ウェルに添加し、5%CO₂ 存在下で3日間培養し、コントロールとした。

(3) 細胞障害活性の測定

(2) で3日間培養したFLh1細胞をエフェクター細胞とし、ヒト Fas抗原を発現する形質転換体 WC8に対する細胞障害活性を測定した。

細胞障害活性の測定は、実施例8および12で用いた方法に従った。

すなわち、 10^6 個の WC8細胞を20 μ Ciの [⁵¹Cr] クロム酸ナトリウム (NEN 社製) を含むRPMI1640培地を用いて37°Cで2時間培養し、⁵¹Crで標識した細胞 (1×10^4) を上記エフェクター細胞と E/T比3対1の割合で混合した。37°Cで5時間培養後、⁵¹Crの遊離を指標に細胞障害活性を測定した。

その結果、アンチセンスオリゴヌクレオチドA41を導入したFLh1細胞では WC8 細胞に対するアポトーシス誘導活性が抑制された（図37）。

（実施例20）アンチセンスオリゴヌクレオチドによる Fasリガンドの発現抑制 - 2

（1）アンチセンスオリゴヌクレオチドの合成

配列表の配列番号31のヒト FasリガンドをコードするDNA 配列を参考に、フォスフォロチオエート型のセンスオリゴヌクレオチド、S50、S163、S338、S484、S714、S905、およびフォスフォロチオエート型のアンチセンスオリゴヌクレオチドA69、A184、A355、A505、A733、A924を公知方法にて合成した（配列表の配列番号63～74）。

このうち、センスオリゴヌクレオチドS50およびアンチセンスオリゴヌクレオチドA69は、それぞれ、配列番号31の50番目から69番目の塩基配列（ACCAGCTGCC ATGCAGCAGC）およびその相補的な配列（GCTGCTGCATGGCAGCTGGT）をもつ20塩基よりなるオリゴヌクレオチドである。

センスオリゴヌクレオチドS163およびアンチセンスオリゴヌクレオチドA184は、それぞれ、配列番号31の163 番目から184 番目の塩基配列（CTGTGCCCAGAA GGCCTGGTCA）およびそれに相補的な塩基配列（TGACCAGGCCTTCTGGGCACAG）をもつ22塩基からなるオリゴヌクレオチドである。

センスオリゴヌクレオチドS338 およびアンチセンスオリゴヌクレオチドA355 は、それぞれ、配列番号31の338 番目から355 番目の塩基配列（CTTGCTAGGATTGG GCCT）およびそれに相補的な塩基配列（AGGCCCAATCCTACCAAG）をもつ18塩基からなるオリゴヌクレオチドである。

センスオリゴヌクレオチドS484およびアンチセンスオリゴヌクレオチドA505は、配列番号31の484番目から505番目の塩基配列（AGCTGAGGAAAGTGGCCC ATTT）およびそれに相補的な塩基配列（AAATGGGCCACTTTCCTCAGCT）をもつ22塩基からなるオリゴヌクレオチドである。

センスオリゴヌクレオチドS714およびアンチセンスオリゴヌクレオチドA733は、それぞれ配列番号31の714番目から733番目の塩基配列（CCCCAGGATCTGGT GATGAT）およびそれに相補的な塩基配列（ATCATCACCAGATCCTGGGG）をもつ20塩基からなるオリゴヌクレオチドである。

センスオリゴヌクレオチドS905およびアンチセンスオリゴヌクレオチドA924はそれぞれ、配列番号31の905番目から924番目の塩基配列（AGAGAAGCACTTTGGG ATTC）およびそれに相補的な塩基配列（GAATCCCAAAGTGCTTCTCT）をもつ20塩基からなるオリゴヌクレオチドである。

得られた上記の合成オリゴヌクレオチドを、それぞれ1 mM濃度となるようにTEバッファーに溶解した。

（2）アンチセンスオリゴヌクレオチドの細胞への導入

まず、ヒト FasリガンドをコードするcDNAを含むプラスミドpEX-hFL1（実施例12（2）参照）でマウス線維芽細胞様細胞株L929を形質転換した。そのうちの1クローンLFLh3細胞を10%のFCSを含むD-MEMに懸濁し、 3.0×10^5 個/2.0ml/ウェルとなるように6ウェルプレート（メンコ社）に植え込み、5%CO₂存在下、37°Cにて一夜培養した。

翌日、（1）で合成したオリゴヌクレオチドを終濃度1 μ Mとなるようにリポフェクトアミン（ギブコ BRL社）40 μ g を含有するオプティ-MEMTM（OPTI-MEMTM

I、ギブコ BRL社) 1,000 μ l に懸濁し、オリゴヌクレオチド-リボフェクトアミン混合液を作製した。5 %CO₂ 存在下、37°Cにて一夜培養し、培地を除去した LFLh3 細胞に上述のオリゴヌクレオチド-リボフェクトアミン混合液を添加した。5 %CO₂ 存在下、37°Cにて 4 時間培養後、20%非働化FCS 及び 1 μ Mオリゴヌクレオチドを含有するD-MEM を1,000 μ l 添加し、さらに16時間培養することにより、LFLh3 細胞に(1)で合成したオリゴヌクレオチドを導入した。

(3) 細胞障害活性の測定

(2)でオリゴヌクレオチドを導入したLFLh3 細胞を回収し、トリプシン溶液で3分間処理した後、細胞障害活性測定用のエフェクター細胞として用いた。

細胞障害活性の測定は、実施例 8 および12で用いた方法に従い行った。

すなわち、10⁶ 個のWC8 細胞を20 μ Ciの [⁵¹Cr] クロム酸ナトリウム (NEN 社) を含むRPMI1640培地を用いて37°Cで2時間培養し、⁵¹Crで標識した細胞 (1 × 10⁴) を上記エフェクター細胞とE/T比1対1の割合で混合した。37°Cで4時間培養後、⁵¹Crの遊離を指標に細胞障害活性を測定した。

その結果、上述のアンチセンスオリゴヌクレオチド、A69, A184, A355, A505, A733, A924を導入したLFLh3 細胞ではWC8 細胞に対するアポトーシス誘導活性が抑制された。これらのアンチセンスオリゴヌクレオチドの特異的細胞溶解抑制率を以下の式より計算し、図38に示した。

$$SCL I (\%) = (1 - (SCL_{AON-LFLh} / SCL_{SON-LFLh})) \times 100$$

SCL I : 特異的細胞溶解抑制率

SCL_{AON-LFLh} : アンチセンスオリゴヌクレオチドを導入したLFLh3 細胞の特異的細胞溶解率

SC L_{SON-LFLh} : センスオリゴヌクレオチドを導入したLFLh3 細胞の特異的
細胞溶解率

(実施例21) ヒト Fasリガンドの細胞外領域の欠失変異体の動物細胞を宿主とする発現

ヒト Fasリガンドの細胞外領域の欠失変異体であるポリペプチドND38、ND40、ND41、ND42、ND43およびCD179 を以下の方法で発現させた。なお、ND38、ND40、ND41、ND42、ND43は、前記式 3 (配列表の配列番号 3) に記載のアミノ酸配列のN末端から、それぞれ38アミノ酸、40アミノ酸、41アミノ酸、42アミノ酸、43アミノ酸が欠失したアミノ酸配列を有するポリペプチドである (すなわち、ND38は配列番号 3 のアミノ酸番号39から179 までのアミノ酸配列を、ND40は配列番号 3 のアミノ酸番号41から179 までのアミノ酸配列を、ND41は配列番号 3 のアミノ酸番号42から179 までのアミノ酸配列を、ND42は配列番号 3 のアミノ酸番号43から179 までのアミノ酸配列を、ND43は配列番号 3 のアミノ酸番号44から179 までのアミノ酸配列を有するポリペプチドである。配列表の配列番号76~80)。

また、ポリペプチドCD179 は前記式 3 (配列表の配列番号 3) に記載のアミノ酸配列のC末端から1アミノ酸が欠失したアミノ酸配列、すなわちアミノ酸番号1から178 までのアミノ酸配列を有するポリペプチドである (配列表の配列番号81)。

(1) プラスミドpM1081の作製

ヒト Fas抗原シグナルペプチドとヒト Fasリガンド細胞外領域をコードする塩基配列であって、サイレントミューテーションにより、ヒト Fas抗原シグナルペプチドをコードする塩基配列中にSpeI、PshAI 認識配列が導入され、ヒト Fasリ

ガンドをコードする塩基配列中にPstI認識配列が導入された塩基配列を有するプラスミドpM1081を以下の方法で作製した。

まず、アンチセンスプライマー 9 (CTTCTGCAGGTGGAAGAGCTGAGCGACACTAGTCAGAAC CAGAGG) を合成した (配列表の配列番号82)。このアンチセンスプライマー 9 は、ヒト Fasリガンド細胞外領域のN末端側とヒト Fas抗原シグナルペプチドのC末端側をコードする塩基配列およびPstIサイト(CTGCAG)、SpeIサイト(ACTAGT)、PshAI サイト(GACTAGTGTCT)を含んでいる。

得られたアンチセンスプライマー 9 と、実施例18(2)で使用したセンスプライマー 8 (TGCGAATTCACCATGCTGGGCATCTGG、このセンスプライマー 8 はEcoRI サイト (GAATTC) およびヒト Fas抗原シグナルペプチドのN末端をコードする配列を含んでいる。) とを、それぞれ100pmol、実施例 1 (3) で使用したプラスミドpBLF58-1を50ng、pfu DNA ポリメラーゼを2.5 U、添付のpfu バッファーを10 μ l 含む100 μ l の溶液を調製した。

実施例18(1)と同様にPCR を行い、PCR 産物をEcoRI およびPstIで二重消化し、アガロースゲル電気泳動に供した。約70bpのDNA 断片を回収し、キアエックスキットを用いてDNA を精製した。実施例18(1)で作製したプラスミドpM1067のEcoRI サイトおよびPstIサイト間に、上述の約70bpのDNA 断片を挿入した。

得られたプラスミドの塩基配列を確認したところ、EcoRI サイトとSpeIサイトとの間に16塩基の欠損があった。そこで、目的とするEcoRI サイトからSpeIサイトまでの配列を構築するためにセンスプライマー 9 (AATTCACCATGCTGGGCATCTGGACCCTCCTACCTCTGGTTCTGA)、アンチセンスプライマー10(CTAGTCAGAACCAGAGGTAGGAGGTCCAGATGCCAGCATGGTG) を合成し、それぞれを1 nmolずつ含む20 μ l のTE溶液

を調整した（配列表の配列番号83および84）。このTE溶液を95℃で5分加熱後、16℃まで徐冷することにより、これらのオリゴヌクレオチドをアニーリングし、二本鎖DNAの両端にそれぞれEcoRI切断配列とSpeI切断配列を持つDNA断片を得た。これを上述の16塩基欠損したプラスミドのEcoRIサイトとSpeIサイト間に挿入し、pM1081を得た。

（2）ポリペプチドND38をコードする塩基配列を有するプラスミドpM1253の作製

まず、センスプライマー11(CTGACTAGTGTGCTAAGGAGCTGAGGAAA)を合成した。これは、ヒトFas抗原シグナルペプチドをコードする塩基配列に加えて、配列表の配列番号3の39番目のリジンから43番目のリジンまでのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有し、配列中にSpeIサイト(ACTAGT)を含んでいる（配列表の配列番号85）。一方、アンチセンスプライマー11として、配列番号15のApaIサイト(GGGCCC)より下流3'側に位置する塩基配列をもとに(TAAGCCGAAAAACGTCTGAG)を化学合成した（配列表の配列番号86）。

得られたセンスプライマー11とアンチセンスプライマー11をそれぞれ100p mol、実施例12（1）で作製したプラスミドpEX-hFL1を50ng、pfu DNAポリメラーゼを2.5 U、添付のpfuバッファーを10μl含む100μlの溶液を調製し、実施例18（1）と同様にPCRを行った。このPCR産物をSpeIおよびApaIで二重消化し、アガロースゲル電気泳動に供した。約400bpのDNA断片を回収し、キアエックスキットを用いてDNAを精製した。（1）で作製したプラスミドpM1081のSpeIサイトとApaIサイトとの間に上述の約400bpのDNA断片を挿入しプラスミドpM1253を得た。

(3) ポリペプチドND40をコードする塩基配列を有するプラスミドpM1254の
作製

まず、センスプライマー12(CTGACTAGTGTCTGCTCTGAGGAAAGTGGCC)を合成した。これは、ヒト Fas抗原シグナルペプチドをコードする塩基配列に加えて、配列表の配列番号3の41番目のロイシンから45番目のアラニンまでのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有し、配列中にSpeIサイト(ACTAGT)を含んでいる(配列表の配列番号87)。

このセンスプライマー12およびアンチセンスプライマー11を用いて(2)と同様にPCRを行い、得られたPCR産物をプラスミドpM1081に挿入して、プラスミドpM1254を得た。

(4) ポリペプチドND41をコードする塩基配列を有するプラスミドpM1255の
作製

まず、センスプライマー13(CTGACTAGTGTCTGCTAGGAAAGTGGCCCAT)を合成した。これは、ヒト Fas抗原シグナルペプチドをコードする塩基配列に加えて、配列表の配列番号3の42番目のアルギニンから46番目のヒスチジンまでのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有し、配列中にSpeIサイト(ACTAGT)を含んでいる(配列表の配列番号88)。

このセンスプライマー13およびアンチセンスプライマー11を用いて(2)と同様にPCRを行い、得られたPCR産物をプラスミドpM1081に挿入して、プラスミドpM1255を得た。

(5) ポリペプチドND42をコードする塩基配列を有するプラスミドpM1256の作製

まず、センスプライマー14(CTGACTAGTGTGCTAAAGTGGCCCATTTA)を合成した。これは、ヒト Fas抗原シグナルペプチドをコードする塩基配列に加えて、配列表の配列番号3の43番目のリジンから47番目のロイシンまでのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有し、配列中にSpeIサイト(ACTAGT)を含んでいる(配列表の配列番号89)。

このセンスプライマー14およびアンチセンスプライマー11を用いて(2)と同様にPCRを行い、得られたPCR産物をプラスミドpM1081に挿入して、プラスミドpM1256を得た。

(6) ポリペプチドND43をコードする塩基配列を有するプラスミドpM1257の作製

まず、センスプライマー15(CTGACTAGTGTGCTGTGGCCCATTTAACA)を合成した。これは、ヒト Fas抗原シグナルペプチドをコードする塩基配列に加えて、配列番号3の44番目のバリンから48番目のスレオニンまでのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有し、配列中にSpeIサイト(ACTAGT)を含んでいる(配列表の配列番号90)。

このセンスプライマー15およびアンチセンスプライマー11を用いて(2)と同様にPCRを行い、得られたPCR産物をプラスミドpM1081に挿入して、プラスミドpM1257を得た。

(7) ポリペプチドCD179をコードする塩基配列を有するプラスミドpM1259の作製

アンチセンスプライマー16(CTTGGTACCCTATTACTTATATAAGCC) およびセンスプライマー16(GAGCTACTGCACTACTGGGC)を合成した。アンチセンスプライマー16は、配列表の配列番号3の175番目のグリシンから178番目のリジンまでのアミノ酸配列をコードする塩基配列と終止コドン(TAA、TAG)、KpnIサイト(GGTACC)を含む。センスプライマー16は、配列番号15のヒト Fasリガンド細胞外領域DNA 配列中のApaIサイト(GGGCCC)より上流5'側に位置する配列である(配列表の配列番号91および92)。

得られたセンスプライマー16とアンチセンスプライマー16それぞれ100pmol、実施例12(1)で作製したプラスミドpEX-hFL1を50ng、pfu DNA ポリメラーゼを2.5 U、添付のpfu バッファーを10 μ l含む100 μ lの溶液を調製し、実施例18(1)と同様にPCRを行った。

このPCR産物をApaIとKpnIとで二重消化し、アガロースゲル電気泳動に供した。約170bpのDNA断片を回収し、キアエックスキットを用いてDNAを精製した。実施例18(2)で作製したpM1250のApaIサイトとKpnIサイトとの間に上述の約170bpのDNA断片を挿入した。得られたプラスミドをpM1259と命名した。

(8) 動物細胞用発現プラスミドpM1083, pM1084, pM1085, pM1086, pM1087, pM1089の作製

上記(2)ないし(7)で得た、プラスミドpM1253, pM1254, pM1255, pM1256, pM1257, およびpM1259をそれぞれEcoRIとKpnIで二重消化し、アガロースゲル電気泳動に供した。

約450bp(ただし、pM1259の消化物の場合は約600bp)のDNA断片を回収し、キアエックスキットを用いてDNAを精製した。実施例18(2)で使用した動物細胞

を宿主に用いた発現用のプラスミドpM1103のEcoRI サイトとKpnIサイトとの間に、上述の約450 あるいは約600bp のDNA 断片を挿入した。

得られたプラスミドをそれぞれpM1083(ND38), pM1084(ND40), pM1085(ND41), pM1086(ND42), pM1087(ND43), およびpM1089(CD179) と命名した。

(9) COS 細胞への導入

実施例18(2)で作製したpM1070並びに(8)で作製したpM1083, pM1084, pM1085, pM1086, pM1087, およびpM1089を実施例18(3)と同様にCOS-1 細胞へ導入し、形質転換体COS-1/pM1070, COS-1/pM1083, COS-1/pM1084, COS-1/pM1085, COS-1/pM1086, COS-1/pM1087, およびCOS-1/pM1089を作製した。

すなわち、0.5 μ g のpM1070、pM1083, pM1084, pM1085, pM1086, pM1087, およびpM1089を、各々別個に 2.5 μ l の10mM Tris-HCl(pH7.4)/1mM EDTA 溶液に溶解した。これらに、それぞれ、0.2mg/mlのDEAE-デキストランおよび50mM Tris-HCl(pH 8)を含有するD-MEM (日水製薬(株)) 0.7ml を添加し、DNA-DEAEデキストラン混合液を作製した。6 ウェルプレート (9.4cm²/ ウェル、ヌンク社) でセミコンフルエントまで単層培養したCOS-1 細胞に上述のDNA-DEAEデキストラン混合液を滴下し、5 %CO₂ 存在下、37°Cにて培養し、形質転換体COS-1/pM1070, COS-1/pM1083, COS-1/pM1084, COS-1/pM1085, COS-1/pM1086, COS-1/pM1087, およびCOS-1/pM1089を得た。

DNA-DEAEデキストラン混合液を滴下してから4時間後に、DNA -DEAEデキストラン混合液を除去し、10%FCS (アーバンサイエンティフィック社)を含有するD-MEM に交換し、さらに96時間培養した。COS-1/pM1070, COS-1/pM1083, COS-1/pM1084, COS-1/pM1085, COS-1/pM1086, COS-1/pM1087, およびCOS-1/pM1089の培

養上清を回収し、以下の実験に供した。

(10) プラスミド導入COS 細胞の培養上清の細胞障害活性の確認

(9) で得た各プラスミド導入COS 細胞の培養上清の細胞障害活性を、WC8 細胞を標的細胞として、実施例 8 および実施例12と同様に測定した。すなわち、 10^6 個のWC8 細胞を、 $20 \mu\text{Ci}$ の $[^51\text{Cr}]$ クロム酸ナトリウム (NEN 社) を含むRPMI1640培地を用いて 37°C で2時間培養し、 ^{51}Cr で標識した。

^{51}Cr で標識した細胞を 1×10^4 個含む反応液中に、(9) で得た細胞培養上清を終濃度 1 %、3 %、10 %、30 %となるように添加し、 37°C で4時間培養後、 ^{51}Cr の遊離を指標に細胞障害活性を測定した。

結果を図39に示した。図39から明らかなように、COS-1/pM1070と同様に、COS-1/pM1083, COS-1/pM1084およびCOS-1/pM1085, およびCOS-1/pM1086の培養上清は、WC8 細胞に対して濃度依存的に細胞障害活性を示した。したがって、これらの培養上清中に含まれるヒト Fasリガンドの欠失変異体は、ヒト Fas抗原と結合してアポトーシスを誘導する活性を有すると考えられた。一方、COS-1/pM1087 およびCOS-1/pM1089の培養上清では、COS-1/pM1070の培養上清に比べ、WC8 細胞に対する顕著な細胞障害活性が認められなかった。したがって、これらの培養上清中に含まれるヒト Fasリガンドの欠失変異体は、アポトーシスを誘導する活性を持たないかもしくは極めて弱い活性しか有していないと考えられた。

このようなアポトーシスを誘導活性の失活の原因は、FasリガンドのN末端あるいはC末端のアミノ酸を欠失したことで、Fasリガンドの立体構造が維持できなくなったためと考えられた。逆に、アポトーシス誘導活性を失うほどN末端もしくはC末端のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列を有するポリペプチドのN末端

もしくはC末端に、立体構造を維持できるようなアミノ酸配列を付加した場合には、それが本来の欠失したアミノ酸配列と異なる場合であっても、アポトーシス誘導活性が再び現れると推測される。また同様に、このような欠失変異体に立体構造を維持できるように、アミノ酸置換を施すことによっても、アポトーシス誘導活性を付与することが可能であることが推測される。

(実施例22) ヒト Fasリガンドの細胞外領域およびそのN末端欠失変異体の大腸菌を宿主とする発現

(1) プラスミドpM468 の作製

プラスミドpM468 は、プラスミドpBR322の誘導体であり、大腸菌内にて複製する機能、アンピシリン耐性遺伝子、トリプトファンプロモーター、アルカリフォスファターゼ (phoA) のシグナルペプチドおよびヒト脾分泌性トリプシンインヒビターをコードするDNA を有するプラスミドとして構築されたプラスミドであり、pM469 (モリシタ H. (Morishita H.) 等、Thrombosis Research, 73 巻、193-204 頁、1994年) のカナマイシン耐性遺伝子をアンピシリン耐性遺伝子に置換して得た。

(2) プラスミドpM1059の作製

(1) で得られたプラスミドpM468 をHindIII、BamHI で二重消化し、0.8 % アガロースゲル (シーケムGTG (SeakeM GTG)、宝酒造社) で分離し、目的とするDNA 断片を含むゲルを切り出した。キアエックスキットを用いて、約3.3 kbpのDNA 断片を精製した。

また、BstEII、KpnI、BamHI サイトを有するように設計したアンチセンスプライマー17(CGCGGATCCGGTACCTTTTTTGGTAACCGGGTAAACAG) とトリプロファンプロモ

ーターのHindIII サイト上流5'側に位置するセンスプライマー17(CGCAAGTTCACGT AAAAAGC)を化学合成した(配列表の配列番号93および94)。アンチセンスプライマー17はBamHI サイト(GGATCC)、KpnIサイト(GGTACC)、BstEIIサイト(GGTACC)、およびアルカリフォスファターゼのシグナルペプチドのC末端側を含んでいる。これらのプライマーを用いてプラスミドpM468を鋳型にしてPCRを行なった。

すなわち、上述のPCR用の鋳型DNAを含む溶液100 μ l中に上記のプライマーを添加し、ジーンアンプキット(Gene AmpTM DNA Amplification Reagent Kit with AmpliTaqTM、宝酒造社)を用いて、94°Cで1分間、55°Cで2分間、72°Cで3分間を1サイクルとして、30サイクルのPCRを行なった。

得られたPCR産物をHindIIIとBamHIで二重消化し4%アガロースゲル電気泳動で分離して約120bpのDNA断片を回収し、DNAを精製した。このDNA断片を上記したプラスミドpM468由来の約3.3kbpのDNA断片とT4 DNAリガーゼ(宝酒造社)を用いてライゲーションし、大腸菌JM109を形質転換することにより、プラスミドpM1059を得た。

(3) ヒト Fasリガンドの細胞外領域の大腸菌を宿主とする発現プラスミドpM1068の作製

センスプライマー18(TTGAAGCTTAAAAAGGGTATAAAATAAAATGCAGCTCTTCCACCT)、アンチセンスプライマー18(AAGGTCGACTATTAGAGCTTATATAAGCC)を化学合成機にて合成した(配列表の配列番号95および96)。センスプライマー18は、大腸菌トリプトファンプロモーター/オペレーターの一部をコードする塩基配列、開始コドン(ATG)、配列表の配列番号3のヒト Fasリガンド細胞外領域のうちのN末端部分

をコードする塩基配列、HindIII サイト(AAGCTT)を含む。アンチセンスプライマー18は配列表の配列番号3のヒト Fasリガンド細胞外領域のC末端部分をコードする塩基配列、終止コドン(TAA, TAG)およびSalIサイト(GTCGAC)を含む。

得られたプライマーをそれぞれ100pmol、実施例12(1)で得たプラスミドpBX-hFL1を50ng、dATP、dCTP、dGTP、dTTPをそれぞれ20nmol、2.5 ユニットのpfu DNA ポリメラーゼと添付のpfu バッファー10 μ l とを含む100 μ l の溶液を調製し、実施例18(1)と同様にPCR を行った。得られたPCR 産物をHindIII とSalI で二重消化し、アガロースゲル電気泳動に供した。

約600bp のDNA 断片を回収し、キアエックスキットを用いてDNA を精製した。

(1)で得たプラスミドpM468 のHindIII サイト、SalIサイト間に上述の約600 bpのDNA 断片を挿入し、pM1068を得た。

(4) ヒト Fasリガンドの細胞外領域の大腸菌を宿主とする分泌発現プラスミド pM1069の作製

センスプライマー19(GGGGGTTACCAAAGCCCAGCTCTTCCACCT)を合成した(配列表の配列番号97)。このセンスプライマーはアルカリフォスファターゼシグナルペプチドの一部をコードする塩基配列、配列表の配列番号3のヒト Fasリガンド細胞外領域のN末端部分をコードする塩基配列、BstEIIサイト(GGTTACC)を含む。

得られたセンスプライマー19と(3)で用いたアンチセンスプライマー18(AAG GTCGACTATTAGAGCTTATATAAGCC)をそれぞれ100pmol、実施例12(1)で得たプラスミドpBX-hFL1を50ng、dATP、dCTP、dGTP、dTTPをそれぞれ20nmol、2.5 ユニットのpfu DNA ポリメラーゼと添付のpfu バッファー10 μ l とを含む100 μ l の溶液を調製し、実施例18(1)と同様にPCR を行った。

得られたPCR産物をBstEIIとSalIで二重消化し、アガロースゲル電気泳動に供した。約600 bpのDNA断片を回収し、キアエックスキットを用いてDNAを精製した。(2)で得たプラスミドpM1059のBstEIIサイトとSalIサイトとの間に挿入し、pM1069を得た。

(5) ヒト Fasリガンドの細胞外領域のN末端38アミノ酸残基を欠損するペプチドの大腸菌を宿主とする分泌発現プラスミドpM1073の作製

センスプライマー20(CCCGGTTACCAAAGCCAAGGAGCTG)、アンチセンスプライマー20(TAAGCCGAAAAACGTCTGAG)を化学合成した(配列表の配列番号98および99)。センスプライマー20はアルカリフォスファターゼシグナルペプチドの一部をコードする塩基配列、配列表の配列番号3のヒト Fasリガンド細胞外領域のうち、N末端アミノ酸38残基を欠損するペプチド(ND38)のN末端をコードする塩基配列、BstEIIサイト(GGTTACC)を含む。アンチセンスプライマー20は、配列表の配列番号15のヒト Fasリガンド細胞外領域DNA配列中のApaIサイト(GGGCCC)より下流3'側に位置する塩基配列である。

得られたプライマーをそれぞれ100pmol、実施例12(1)で得たプラスミドpBX-hFL1を50ng、dATP、dCTP、dGTP、dTTPをそれぞれ20nmol、2.5ユニットのpfu DNAポリメラーゼと添付のpfuバッファー10 μ lとを含む100 μ lの溶液を調製し、実施例18(1)と同様にPCRを行った。得られたPCR産物をBstEIIとApaIで二重消化し、アガロースゲル電気泳動に供した。約300 bpのDNA断片を回収し、キアエックスキットを用いてDNAを精製した。(4)で得たプラスミドpM1069のBstEIIサイト、ApaIサイト間に上述の約300 bpのDNA断片を挿入し、pM1073を得た。

(6) 形質転換体の作製およびヒト Fasリガンドの発現

(3)、(4)、(5) で得たプラスミド pM1068, pM1069, pM1073 を用い、ハナハンの方法 (Hanahan, D. 著、Techniques for Transformation of E. Coli. In : DNA cloning, Vol.1, Glover, D.M. (ed), 109-136 頁、IRL 出版 (IRL Press), 1985 年) により大腸菌 JE5505 株を形質転換し、組換え大腸菌 JE5505(pM1068), JE5505(pM1069), JE5505(pM1073) を作製した。

得られた形質転換体それぞれを、50 μ g/ml のアンピシリン含有 L-ブコース 5 ml にて一夜培養した。次いで 50 μ g/ml アンピシリン含有 M9CA 培地 25 ml にこの培養液 0.5 ml を植菌し、37°C にて 3 ないし 4 時間培養した後、培養液の OD₅₅₀ がおよそ 1 になった時点で培地に終濃度 10 μ g/ml の 3 β -インドールアクリル酸 (和光純薬工業社) を添加し、さらに約 24 時間培養した。得られた培養混合物を遠心分離し、上清と菌体をそれぞれ回収した。

(7) 形質転換体の菌体および培養上清を使用したウエスタンブロッティング

実施例 18 (5) と同様にヒト Fasリガンドのアミノ酸配列の一部 (P S P P P E K K E L R K V A H) を認識するウサギ抗血清を用いてウエスタンブロッティングを行った。

まず、(6) で得た形質転換体 JE5505(pM1068), JE5505(pM1069) および JE5505(pM1073) の菌体 (1 ml の培養液相当) に RIPA バッファー (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 0.2 U/ml Aprotinin を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)) 1 ml を加え、30 分間攪拌した後、遠心し、その上清を回収した。得られた形質転換体由来の上清および (6) で得た形質転換体の培養上清 10 μ l を、それぞれ蒸留水 5 μ l と混合した。これらに ; 4% SDS、80% グリセ

ロール、0.04%BPB を含む溶液 5 μ l ; もしくは 4 %SDS 、80%グリセロール、8 %DTT 、0.04%BPB を含む溶液 5 μ l を加え、それぞれ37°Cで1時間処理した後、SDS-PAGEを行った。泳動終了後、PVDF膜（アトー社）に室温にて200mA 、60分の条件で転写した。スキムミルク（雪印乳業（株））を使用して4°Cで一夜反応させ、ブロッキングを行ったのち、メンブレンをPBS で1回、0.1% Tween 20/PBS で2回洗浄した。

上述のウサギ抗血清を0.5% BSA/0.1% Tween 20/PBSで1,000 倍に希釈し、37°Cで1時間反応させた。反応終了後、0.1% Tween 20/PBS で2回洗浄した。洗浄後さらに0.5% BSA/0.1% Tween 20/PBSで500 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ウサギイムノグロブリン抗体（Cat. 番号P448、ダコ(DAKO)社）溶液に浸し、室温で1時間反応させた。メンブレンを0.1% Tween 20/PBS で5回洗浄し、表面の水を切り、ECL システム（アマーシャム社）で検出した。

図40に示したようにJE5505(pM1068)の形質転換体および培養上清中にヒト Fasリガンド細胞外領域に相当するバンドが、非還元条件下では約21kD付近と23kD付近に2本、還元条件下では約23kD付近に1本認められた。

また、図41に示したように、JE5505(pM1069)の形質転換体および培養上清中に、ヒト Fasリガンド細胞外領域に相当する明瞭なバンドが、非還元条件下、還元条件下の両者において23kD付近に認められた。

（参考例1）gld(C3H gld/gld) マウスからの Fasリガンドに対するcDNAのクローニング

gld(C3H gld/gld) マウスの脾臓細胞を実施例14の方法で培養し、実施例14の方法で1本鎖cDNAの合成およびPCR を行った。得られたPCR 産物を、XbaIで制

限酵素処理後、1%アガロースゲルで分離し、約940bpDNAフラグメントを回収した。これを、pBluescript II KS(+)のXbaIサイトにサブクローニングし、その塩基配列を決定した。得られた塩基配列を、実施例14(1)で確認した配列と比較したところ、得られたPCR産物の配列は、実施例14(1)で得られた配列の3'末端近くのT(配列番号32の塩基番号849)がCに変異していることが明らかになった(配列表の配列番号100)。この1塩基の変異により、アミノ酸配列にも変異が生じていた。すなわち、gldマウスにおいては、マウスFasリガンドの細胞外領域に位置する273番目のアミノ酸がフェニルアラニンからロイシンに変異していた。

(参考例2) gldマウス由来のFasリガンドの細胞障害活性

参考例1で得られた約940bpのXbaIフラグメントを、動物細胞発現ベクターpEF-BOSのXbaI部位に挿入した。実施例(2)と同様の方法で、COS細胞を形質転換した。形質転換したCOS細胞をエフェクター細胞とし、実施例14(3)の方法で細胞障害活性を測定した。その結果、gldマウスより得られたFasリガンドcDNAで形質転換させたCOS細胞は細胞障害活性を示さなかった(図26)。以上の結果より、自己免疫疾患のモデルであるgldマウスでは、Fasリガンドによるアポトーシスの誘導が正常に起こらないことが確認された。

今回の結果と、オガサワラ(Ogasawara J.)等の報告から、自己免疫疾患の原因として、Fas抗原の異常およびFasリガンドの異常の少なくとも2つがあることが示唆された。いずれの場合も、自己反応性のT細胞にアポトーシスを誘導することができず、自己反応性のT細胞が生体内より除去されなかったため、自己免疫疾患が生じることが予想された。

産業上の有用性

本発明により、Fasリガンドおよびその一部である新規ポリペプチドが提供される。当該新規ポリペプチドは、Fas抗原を介したアポトーシスが関与する疾患、たとえば自己免疫疾患や、ウイルス感染の治療薬として開発する事ができる。また、当該新規ポリペプチドは抗体を作製する際の抗原として使用できるほか、試料中の当該ポリペプチドを、抗体を使用して競合反応にて測定する際に使用することができる。

本発明によればまた、Fasリガンドもしくはその一部をコードするDNA が提供される。

当該DNA は、前記新規ポリペプチドを遺伝子工学的手法を使用して、工業的に大量生産するために使用できる。また、DNA プローブを作製するためにも使用できる。さらに、自己免疫疾患では、遺伝的にアポトーシスの機構が欠損しているケースが考えられるが、当該新規DNA は、このような疾患の遺伝子治療にも使用する事ができる。

さらに、DNA 配列が明らかになったことにより、Fasリガンド遺伝子もしくはFasリガンドに対するmRNAの一部に相補的な塩基配列を含むオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体が提供される。当該オリゴヌクレオチドは、Fasリガンドの発現を調節するために使用できる他、診断用プローブとしても利用できる。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 1 3 7

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Lys	Val	Ala	His	Leu	Thr	Gly	Lys	Ser	Asn	Ser	Arg	Ser	Met	Pro
1				5					10				15	
Leu	Glu	Trp	Glu	Asp	Thr	Tyr	Gly	Ile	Val	Leu	Leu	Ser	Gly	Val
				20					25				30	
Lys	Tyr	Lys	Lys	Gly	Gly	Leu	Val	Ile	Asn	Glu	Thr	Gly	Leu	Tyr
				35					40				45	
Phe	Val	Tyr	Ser	Lys	Val	Tyr	Phe	Arg	Gly	Gln	Ser	Cys	Asn	Asn
				50					55				60	
Leu	Pro	Leu	Ser	His	Lys	Val	Tyr	Met	Arg	Asn	Ser	Lys	Tyr	Pro
				65					70				75	
Gln	Asp	Leu	Val	Met	Met	Glu	Gly	Lys	Met	Met	Ser	Tyr	Cys	Thr
				80					85				90	
Thr	Gly	Gln	Met	Trp	Ala	Arg	Ser	Ser	Tyr	Leu	Gly	Ala	Val	Phe
				95					100				105	
Asn	Leu	Thr	Ser	Ala	Asp	His	Leu	Tyr	Val	Asn	Val	Ser	Glu	Leu
				110					115				120	

Ser Leu Val Asn Phe Glu Glu Ser Gln Thr Phe Phe Gly Leu Tyr

125

130

135

Lys Leu

137

配列番号 : 2

配列の長さ : 1 3 8

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Arg Lys Val Ala His Leu Thr Gly Lys Ser Asn Ser Arg Ser Met

1

5

10

15

Pro Leu Glu Trp Glu Asp Thr Tyr Gly Ile Val Leu Leu Ser Gly

20

25

30

Val Lys Tyr Lys Lys Gly Gly Leu Val Ile Asn Glu Thr Gly Leu

35

40

45

Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn

50

55

60

Asn Leu Pro Leu Ser His Lys Val Tyr Met Arg Asn Ser Lys Tyr

65

70

75

Pro Gln Asp Leu Val Met Met Glu Gly Lys Met Met Ser Tyr Cys

80

85

90

Thr Thr Gly Gln Met Trp Ala Arg Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Val
 95 100 105
 Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp His Leu Tyr Val Asn Val Ser Glu
 110 115 120
 Leu Ser Leu Val Asn Phe Glu Glu Ser Gln Thr Phe Phe Gly Leu
 125 130 135
 Tyr Lys Leu
 138

配列番号 : 3

配列の長さ : 1 7 9

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Gln Leu Phe His Leu Gln Lys Glu Leu Ala Glu Leu Arg Glu Ser
 1 5 10 15
 Thr Ser Gln Met His Thr Ala Ser Ser Leu Glu Lys Gln Ile Gly
 20 25 30
 His Pro Ser Pro Pro Pro Glu Lys Lys Glu Leu Arg Lys Val Ala
 35 40 45
 His Leu Thr Gly Lys Ser Asn Ser Arg Ser Met Pro Leu Glu Trp
 50 55 60

Glu Asp Thr Tyr Gly Ile Val Leu Leu Ser Gly Val Lys Tyr Lys			
65	70	75	
Lys Gly Gly Leu Val Ile Asn Glu Thr Gly Leu Tyr Phe Val Tyr			
80	85	90	
Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn Asn Leu Pro Leu			
95	100	105	
Ser His Lys Val Tyr Met Arg Asn Ser Lys Tyr Pro Gln Asp Leu			
110	115	120	
Val Met Met Glu Gly Lys Met Met Ser Tyr Cys Thr Thr Gly Gln			
125	130	135	
Met Trp Ala Arg Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Val Phe Asn Leu Thr			
140	145	150	
Ser Ala Asp His Leu Tyr Val Asn Val Ser Glu Leu Ser Leu Val			
155	160	165	
Asn Phe Glu Glu Ser Gln Thr Phe Phe Gly Leu Tyr Lys Leu			
170	175	179	

配列番号 : 4

配列の長さ : 2 8 1

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Met	Gln	Gln	Pro	Phe	Asn	Tyr	Pro	Tyr	Pro	Gln	Ile	Tyr	Trp	Val
1				5					10					15
Asp	Ser	Ser	Ala	Ser	Ser	Pro	Trp	Ala	Pro	Pro	Gly	Thr	Val	Leu
				20					25					30
Pro	Cys	Pro	Thr	Ser	Val	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Gln	Arg	Arg	Pro
				35					40					45
Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Leu	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro
				50					55					60
Pro	Pro	Leu	Pro	Pro	Leu	Pro	Leu	Pro	Pro	Leu	Lys	Lys	Arg	Gly
				65					70					75
Asn	His	Ser	Thr	Gly	Leu	Cys	Leu	Leu	Val	Met	Phe	Phe	Met	Val
				80					85					90
Leu	Val	Ala	Leu	Val	Gly	Leu	Gly	Leu	Gly	Met	Phe	Gln	Leu	Phe
				95					100					105
His	Leu	Gln	Lys	Glu	Leu	Ala	Glu	Leu	Arg	Glu	Ser	Thr	Ser	Gln
				110					115					120
Met	His	Thr	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Lys	Gln	Ile	Gly	His	Pro	Ser
				125					130					135
Pro	Pro	Pro	Glu	Lys	Lys	Glu	Leu	Arg	Lys	Val	Ala	His	Leu	Thr
				140					145					150
Gly	Lys	Ser	Asn	Ser	Arg	Ser	Met	Pro	Leu	Glu	Trp	Glu	Asp	Thr
				155					160					165

Tyr Gly Ile Val Leu Leu Ser Gly Val Lys Tyr Lys Lys Gly Gly

170

175

180

Leu Val Ile Asn Glu Thr Gly Leu Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Val

185

190

195

Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn Asn Leu Pro Leu Ser His Lys

200

205

210

Val Tyr Met Arg Asn Ser Lys Tyr Pro Gln Asp Leu Val Met Met

215

220

225

Glu Gly Lys Met Met Ser Tyr Cys Thr Thr Gly Gln Met Trp Ala

230

235

240

Arg Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Val Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp

245

250

255

His Leu Tyr Val Asn Val Ser Glu Leu Ser Leu Val Asn Phe Glu

260

265

270

Glu Ser Gln Thr Phe Phe Gly Leu Tyr Lys Leu

275

280 281

配列番号 : 5

配列の長さ : 1 3 7

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : タンパク質

配列 :

配列番号：6

配列の長さ : 1 3 8

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Arg Ser Val Ala His Leu Thr Gly Asn Pro Arg Ser Arg Ser Ile

1 5 10 15

Pro Leu Glu Trp Glu Asp Thr Tyr Gly Thr Ala Leu Ile Ser Gly

20 25 30

Val Lys Tyr Lys Lys Gly Gly Leu Val Ile Asn Glu Ala Gly Leu

35 40 45

Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn

50 55 60

Ser Gln Pro Leu Ser His Lys Val Tyr Met Arg Asn Phe Lys Tyr

65 70 75

Pro Gly Asp Leu Val Leu Met Glu Glu Lys Lys Leu Asn Tyr Cys

80 85 90

Thr Thr Gly Gln Ile Trp Ala His Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Val

95 100 105

Phe Asn Leu Thr Val Ala Asp His Leu Tyr Val Asn Ile Ser Gln

110 115 120

Leu Ser Leu Ile Asn Phe Glu Glu Ser Lys Thr Phe Phe Gly Leu

125 130 135

Tyr Lys Leu

138

配列番号 : 7

配列の長さ : 1 7 9

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Gln	Leu	Phe	His	Leu	Gln	Lys	Glu	Leu	Ala	Glu	Leu	Arg	Glu	Phe
1				5					10					15
Thr	Asn	His	Ser	Leu	Arg	Val	Ser	Ser	Phe	Glu	Lys	Gln	Ile	Ala
				20					25					30
Asn	Pro	Ser	Thr	Pro	Ser	Glu	Thr	Lys	Lys	Pro	Arg	Ser	Val	Ala
				35					40					45
His	Leu	Thr	Gly	Asn	Pro	Arg	Ser	Arg	Ser	Ile	Pro	Leu	Glu	Trp
				50					55					60
Glu	Asp	Thr	Tyr	Gly	Thr	Ala	Leu	Ile	Ser	Gly	Val	Lys	Tyr	Lys
				65					70					75
Lys	Gly	Gly	Leu	Val	Ile	Asn	Glu	Ala	Gly	Leu	Tyr	Phe	Val	Tyr
				80					85					90
Ser	Lys	Val	Tyr	Phe	Arg	Gly	Gln	Ser	Cys	Asn	Ser	Gln	Pro	Leu
				95					100					105

Ser His Lys Val Tyr Met Arg Asn Phe Lys Tyr Pro Gly Asp Leu

110

115

120

Val Leu Met Glu Glu Lys Lys Leu Asn Tyr Cys Thr Thr Gly Gln

125

130

135

Ile Trp Ala His Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Val Phe Asn Leu Thr

140

145

145

Val Ala Asp His Leu Tyr Val Asn Ile Ser Gln Leu Ser Leu Ile

150

155

160

Asn Phe Glu Glu Ser Lys Thr Phe Phe Gly Leu Tyr Lys Leu

165

170

179

配列番号 : 8

配列の長さ : 2 7 8

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Met Gln Gln Pro Val Asn Tyr Pro Cys Pro Gln Ile Tyr Trp Val

5

10

15

Asp Ser Ser Ala Thr Ser Pro Trp Ala Pro Pro Gly Ser Val Phe

20

25

30

Ser Cys Pro Ser Ser Gly Pro Arg Gly Pro Gly Gln Arg Arg Pro

35

40

45

Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ser Pro Leu Pro Pro Pro Ser Gln			
	50	55	60
Pro Pro Pro Leu Pro Pro Leu Ser Pro Leu Lys Lys Lys Asp Asn			
	65	70	75
Ile Glu Leu Trp Leu Pro Val Ile Phe Phe Met Val Leu Val Ala			
	80	85	90
Leu Val Gly Met Gly Leu Gly Met Tyr Gln Leu Phe His Leu Gln			
	95	100	105
Lys Glu Leu Ala Glu Leu Arg Glu Phe Thr Asn His Ser Leu Arg			
	110	115	120
Val Ser Ser Phe Glu Lys Gln Ile Ala Asn Pro Ser Thr Pro Ser			
	125	130	135
Glu Thr Lys Lys Pro Arg Ser Val Ala His Leu Thr Gly Asn Pro			
	140	145	150
Arg Ser Arg Ser Ile Pro Leu Glu Trp Glu Asp Thr Tyr Gly Thr			
	155	160	165
Ala Leu Ile Ser Gly Val Lys Tyr Lys Lys Gly Gly Leu Val Ile			
	170	175	180
Asn Glu Ala Gly Leu Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Val Tyr Phe Arg			
	185	190	195
Gly Gln Ser Cys Asn Ser Gln Pro Leu Ser His Lys Val Tyr Met			
	200	205	210

Arg Asn Phe Lys Tyr Pro Gly Asp Leu Val Leu Met Glu Glu Lys

215 220 225

Lys Leu Asn Tyr Cys Thr Thr Gly Gln Ile Trp Ala His Ser Ser

230 235 240

Tyr Leu Gly Ala Val Phe Asn Leu Thr Val Ala Asp His Leu Tyr

245 250 255

Val Asn Ile Ser Gln Leu Ser Leu Ile Asn Phe Glu Glu Ser Lys

260 265 270

Thr Phe Phe Gly Leu Tyr Lys Leu

275 278

配列番号 : 9

配列の長さ : 1 3 7

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Ser Val Ala His Leu Thr Gly Asn Pro His Ser Arg Ser Ile Pro

1 5 10 15

Leu Glu Trp Glu Asp Thr Tyr Gly Thr Ala Leu Ile Ser Gly Val

20 25 30

Lys Tyr Lys Lys Gly Gly Leu Val Ile Asn Glu Thr Gly Leu Tyr

35 40 45

Phe Val Tyr Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn Asn
 50 55 60
 Gln Pro Leu Asn His Lys Val Tyr Met Arg Asn Ser Lys Tyr Pro
 65 70 75
 Glu Asp Leu Val Leu Met Glu Glu Lys Arg Leu Asn Tyr Cys Thr
 80 85 90
 Thr Gly Gln Ile Trp Ala His Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Val Phe
 95 100 105
 Asn Leu Thr Ser Ala Asp His Leu Tyr Val Asn Ile Ser Gln Leu
 110 115 120
 Ser Leu Ile Asn Phe Glu Glu Ser Lys Thr Phe Phe Gly Leu Tyr
 125 130 135
 Lys Leu
 137

配列番号 : 1 0

配列の長さ : 1 3 8

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Arg Ser Val Ala His Leu Thr Gly Asn Pro His Ser Arg Ser Ile
 1 5 10 15

Pro Leu Glu Trp Glu Asp Thr Tyr Gly Thr Ala Leu Ile Ser Gly

20

25

30

Val Lys Tyr Lys Lys Gly Gly Leu Val Ile Asn Glu Thr Gly Leu

35

40

45

Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn

50

55

60

Asn Gln Pro Leu Asn His Lys Val Tyr Met Arg Asn Ser Lys Tyr

65

70

75

Pro Glu Asp Leu Val Leu Met Glu Glu Lys Arg Leu Asn Tyr Cys

80

85

90

Thr Thr Gly Gln Ile Trp Ala His Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Val

95

100

105

Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp His Leu Tyr Val Asn Ile Ser Gln

110

115

120

Leu Ser Leu Ile Asn Phe Glu Glu Ser Lys Thr Phe Phe Gly Leu

125

130

135

Tyr Lys Leu

138

配列番号 : 1 1

配列の長さ : 1 7 9

配列の型 : アミノ酸

配列の種類：タンパク質

配列：

Gln	Leu	Phe	His	Leu	Gln	Lys	Glu	Leu	Ala	Glu	Leu	Arg	Glu	Phe
1				5					10					15
Thr	Asn	Gln	Ser	Leu	Lys	Val	Ser	Ser	Phe	Glu	Lys	Gln	Ile	Ala
				20					25					30
Asn	Pro	Ser	Thr	Pro	Ser	Glu	Lys	Lys	Glu	Pro	Arg	Ser	Val	Ala
				35					40					45
His	Leu	Thr	Gly	Asn	Pro	His	Ser	Arg	Ser	Ile	Pro	Leu	Glu	Trp
				50					55					60
Glu	Asp	Thr	Tyr	Gly	Thr	Ala	Leu	Ile	Ser	Gly	Val	Lys	Tyr	Lys
				65					70					75
Lys	Gly	Gly	Leu	Val	Ile	Asn	Glu	Thr	Gly	Leu	Tyr	Phe	Val	Tyr
				80					85					90
Ser	Lys	Val	Tyr	Phe	Arg	Gly	Gln	Ser	Cys	Asn	Asn	Gln	Pro	Leu
				95					100					105
Asn	His	Lys	Val	Tyr	Met	Arg	Asn	Ser	Lys	Tyr	Pro	Glu	Asp	Leu
				110					115					120
Val	Leu	Met	Glu	Glu	Lys	Arg	Leu	Asn	Tyr	Cys	Thr	Thr	Gly	Gln
				125					130					135
Ile	Trp	Ala	His	Ser	Ser	Tyr	Leu	Gly	Ala	Val	Phe	Asn	Leu	Thr
				140					145					150

Ser Ala Asp His Leu Tyr Val Asn Ile Ser Gln Leu Ser Leu Ile

155

160

165

Asn Phe Glu Glu Ser Lys Thr Phe Phe Gly Leu Tyr Lys Leu

170

175

179

配列番号 : 1 2

配列の長さ : 2 7 9

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Met Gln Gln Pro Met Asn Tyr Pro Cys Pro Gln Ile Phe Trp Val

5

10

15

Asp Ser Ser Ala Thr Ser Ser Trp Ala Pro Pro Gly Ser Val Phe

20

25

30

Pro Cys Pro Ser Cys Gly Pro Arg Gly Pro Asp Gln Arg Arg Pro

35

40

45

Pro Pro Pro Pro Pro Pro Val Ser Pro Leu Pro Pro Pro Ser Gln

50

55

60

Pro Leu Pro Leu Pro Pro Leu Thr Pro Leu Lys Lys Lys Asp His

65

70

75

Asn Thr Asn Leu Trp Leu Pro Val Val Phe Phe Met Val Leu Val

80

85

90

Ala Leu Val Gly Met Gly Leu Gly Met Tyr Gln Leu Phe His Leu			
	95	100	105
Gln Lys Glu Leu Ala Glu Leu Arg Glu Phe Thr Asn Gln Ser Leu			
	110	115	120
Lys Val Ser Ser Phe Glu Lys Gln Ile Ala Asn Pro Ser Thr Pro			
	125	130	135
Ser Glu Lys Lys Glu Pro Arg Ser Val Ala His Leu Thr Gly Asn			
	140	145	150
Pro His Ser Arg Ser Ile Pro Leu Glu Trp Glu Asp Thr Tyr Gly			
	155	160	165
Thr Ala Leu Ile Ser Gly Val Lys Tyr Lys Lys Gly Gly Leu Val			
	170	175	180
Ile Asn Glu Thr Gly Leu Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Val Tyr Phe			
	185	190	195
Arg Gly Gln Ser Cys Asn Asn Gln Pro Leu Asn His Lys Val Tyr			
	200	205	210
Met Arg Asn Ser Lys Tyr Pro Glu Asp Leu Val Leu Met Glu Glu			
	215	220	225
Lys Arg Leu Asn Tyr Cys Thr Thr Gly Gln Ile Trp Ala His Ser			
	230	235	240
Ser Tyr Leu Gly Ala Val Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp His Leu			
	245	250	255

Tyr Val Asn Ile Ser Gln Leu Ser Leu Ile Asn Phe Glu Glu Ser

260

265

270

Lys Thr Phe Phe Gly Leu Tyr Lys Leu

275

279

配列番号 : 1 3

配列の長さ : 4 1 1

配列の型 : 核酸

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列 :

AAA GTG GCC CAT TTA ACA GGC AAG TCC AAC TCA AGG TCC ATG CCT	45
CTG GAA TGG GAA GAC ACC TAT GGA ATT GTC CTG CTT TCT GGA GTG	90
AAG TAT AAG AAG GGT GGC CTT GTG ATC AAT GAA ACT GGG CTG TAC	135
TTT GTA TAT TCC AAA GTA TAC TTC CGG GGT CAA TCT TGC AAC AAC	180
CTG CCC CTG AGC CAC AAG GTC TAC ATG AGG AAC TCT AAG TAT CCC	225
CAG GAT CTG GTG ATG ATG GAG GGG AAG ATG ATG AGC TAC TGC ACT	270
ACT GGG CAG ATG TGG GCC CGC AGC AGC TAC CTG GGG GCA GTG TTC	315
AAT CTT ACC AGT GCT GAT CAT TTA TAT GTC AAC GTA TCT GAG CTC	360
TCT CTG GTC AAT TTT GAG GAA TCT CAG ACG TTT TTC GGC TTA TAT	405
AAG CTC	411

配列番号 : 1 4

配列の長さ : 4 1 4

配列の型 : 核酸

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列 :

```
AGG AAA GTG GCC CAT TTA ACA GGC AAG TCC AAC TCA AGG TCC ATG    45
CCT CTG GAA TGG GAA GAC ACC TAT GGA ATT GTC CTG CTT TCT GGA    90
GTG AAG TAT AAG AAG GGT GGC CTT GTG ATC AAT GAA ACT GGG CTG   135
TAC TTT GTA TAT TCC AAA GTA TAC TTC CGG GGT CAA TCT TGC AAC   180
AAC CTG CCC CTG AGC CAC AAG GTC TAC ATG AGG AAC TCT AAG TAT   225
CCC CAG GAT CTG GTG ATG ATG GAG GGG AAG ATG ATG AGC TAC TGC   270
ACT ACT GGG CAG ATG TGG GCC CGC AGC AGC TAC CTG GGG GCA GTG   315
TTC AAT CTT ACC AGT GCT GAT CAT TTA TAT GTC AAC GTA TCT GAG   360
CTC TCT CTG GTC AAT TTT GAG GAA TCT CAG ACG TTT TTC GGC TTA   405
TAT AAG CTC                                                    414
```

配列番号 : 1 5

配列の長さ : 5 3 7

配列の型 : 核酸

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列 :

```
CAG CTC TTC CAC CTA CAG AAG GAG CTG GCA GAA CTC CGA GAG TCT 45
ACC AGC CAG ATG CAC ACA GCA TCA TCT TTG GAG AAG CAA ATA GGC 90
```

CAC CCC AGT CCA CCC CCT GAA AAA AAG GAG CTG AGG AAA GTG GCC 135
CAT TTA ACA GGC AAG TCC AAC TCA AGG TCC ATG CCT CTG GAA TGG 180
GAA GAC ACC TAT GGA ATT GTC CTG CTT TCT GGA GTG AAG TAT AAG 225
AAG GGT GGC CTT GTG ATC AAT GAA ACT GGG CTG TAC TTT GTA TAT 270
TCC AAA GTA TAC TTC CGG GGT CAA TCT TGC AAC AAC CTG CCC CTG 315
AGC CAC AAG GTC TAC ATG AGG AAC TCT AAG TAT CCC CAG GAT CTG 360
GTG ATG ATG GAG GGG AAG ATG ATG AGC TAC TGC ACT ACT GGG CAG 405
ATG TGG GCC CGC AGC AGC TAC CTG GGG GCA GTG TTC AAT CTT ACC 450
AGT GCT GAT CAT TTA TAT GTC AAC GTA TCT GAG CTC TCT CTG GTC 495
AAT TTT GAG GAA TCT CAG ACG TTT TTC GGC TTA TAT AAG CTC 537

配列番号 : 1 6

配列の長さ : 8 4 3

配列の型 : 核酸

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列 :

ATG CAG CAG CCC TTC AAT TAC CCA TAT CCC CAG ATC TAC TGG GTG 45
GAC AGC AGT GCC AGC TCT CCC TGG GCC CCT CCA GGC ACA GTT CTT 90
CCC TGT CCA ACC TCT GTG CCC AGA AGG CCT GGT CAA AGG AGG CCA 135
CCA CCA CCA CCG CCA CCG CCA CCA CTA CCA CCT CCG CCG CCG CCG 180
CCA CCA CTG CCT CCA CTA CCG CTG CCA CCC CTG AAG AAG AGA GGG 225
AAC CAC AGC ACA GGC CTG TGT CTC CTT GTG ATG TTT TTC ATG GTT 270

CTG GTT GCC TTG GTA GGA TTG GGC CTG GGG ATG TTT CAG CTC TTC 315
CAC CTA CAG AAG GAG CTG GCA GAA CTC CGA GAG TCT ACC AGC CAG 360
ATG CAC ACA GCA TCA TCT TTG GAG AAG CAA ATA GGC CAC CCC AGT 405
CCA CCC CCT GAA AAA AAG GAG CTG AGG AAA GTG GCC CAT TTA ACA 450
GGC AAG TCC AAC TCA AGG TCC ATG CCT CTG GAA TGG GAA GAC ACC 495
TAT GGA ATT GTC CTG CTT TCT GGA GTG AAG TAT AAG AAG GGT GGC 540
CTT GTG ATC AAT GAA ACT GGG CTG TAC TTT GTA TAT TCC AAA GTA 585
TAC TTC CGG GGT CAA TCT TGC AAC AAC CTG CCC CTG AGC CAC AAG 630
GTC TAC ATG AGG AAC TCT AAG TAT CCC CAG GAT CTG GTG ATG ATG 675
GAG GGG AAG ATG ATG AGC TAC TGC ACT ACT GGG CAG ATG TGG GCC 720
CGC AGC AGC TAC CTG GGG GCA GTG TTC AAT CTT ACC AGT GCT GAT 765
CAT TTA TAT GTC AAC GTA TCT GAG CTC TCT CTG GTC AAT TTT GAG 810
GAA TCT CAG ACG TTT TTC GGC TTA TAT AAG CTC 843

配列番号 : 1 7

配列の長さ : 4 1 1

配列の型 : 核酸

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列 :

AGT GTG GCC CAC TTA ACA GGG AAC CCC CGC TCA AGG TCC ATC CCT 45
CTG GAA TGG GAA GAC ACA TAT GGA ACT GCT TTG ATC TCT GGA GTG 90
AAG TAT AAG AAA GGC GGC CTT GTG ATC AAT GAG GCT GGG TTG TAC 135

TTC GTA TAT TCC AAA GTA TAC TTC CGG GGT CAG TCT TGC AAC AGC 180
CAG CCC CTA AGC CAC AAG GTC TAT ATG AGG AAC TTT AAG TAT CCT 225
GGG GAT CTG GTG CTA ATG GAG GAG AAG AAG TTG AAT TAC TGC ACT 270
ACT GGC CAG ATA TGG GCC CAC AGC AGC TAC CTA GGG GCA GTA TTT 315
AAT CTT ACC GTT GCT GAC CAT TTA TAT GTC AAC ATA TCT CAA CTC 360
TCT CTG ATC AAT TTT GAG GAA TCT AAG ACC TTT TTT GGC TTA TAT 405
AAG CTT 411

配列番号 : 1 8

配列の長さ : 4 1 4

配列の型 : 核酸

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列 :

AGG AGT GTG GCC CAC TTA ACA GGG AAC CCC CGC TCA AGG TCC ATC 45
CCT CTG GAA TGG GAA GAC ACA TAT GGA ACT GCT TTG ATC TCT GGA 90
GTG AAG TAT AAG AAA GGC GGC CTT GTG ATC AAT GAG GCT GGG TTG 135
TAC TTC GTA TAT TCC AAA GTA TAC TTC CGG GGT CAG TCT TGC AAC 180
AGC CAG CCC CTA AGC CAC AAG GTC TAT ATG AGG AAC TTT AAG TAT 225
CCT GGG GAT CTG GTG CTA ATG GAG GAG AAG AAG TTG AAT TAC TGC 270
ACT ACT GGC CAG ATA TGG GCC CAC AGC AGC TAC CTA GGG GCA GTA 315
TTT AAT CTT ACC GTT GCT GAC CAT TTA TAT GTC AAC ATA TCT CAA 360
CTC TCT CTG ATC AAT TTT GAG GAA TCT AAG ACC TTT TTT GGC TTA 405

TAT AAG CTT

414

配列番号 : 1 9

配列の数 : 5 3 7

配列の型 : 核酸

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列 :

```
CAA CTC TTT CAT CTA CAG AAG GAA CTG GCA GAA CTC CGT GAG TTC 45
ACC AAC CAC AGC CTT AGA GTA TCA TCT TTT GAA AAG CAA ATA GCC 90
AAC CCC AGC ACA CCC TCT GAA ACC AAA AAG CCA AGG AGT GTG GCC 135
CAC TTA ACA GGG AAC CCC CGC TCA AGG TCC ATC CCT CTG GAA TGG 180
GAA GAC ACA TAT GGA ACT GCT TTG ATC TCT GGA GTG AAG TAT AAG 225
AAA GGC GGC CTT GTG ATC AAT GAG GCT GGG TTG TAC TTC GTA TAT 270
TCC AAA GTA TAC TTC CGG GGT CAG TCT TGC AAC AGC CAG CCC CTA 315
AGC CAC AAG GTC TAT ATG AGG AAC TTT AAG TAT CCT GGG GAT CTG 360
GTG CTA ATG GAG GAG AAG AAG TTG AAT TAC TGC ACT ACT GGC CAG 405
ATA TGG GCC CAC AGC AGC TAC CTA GGG GCA GTA TTT AAT CTT ACC 450
GTT GCT GAC CAT TTA TAT GTC AAC ATA TCT CAA CTC TCT CTG ATC 495
AAT TTT GAG GAA TCT AAG ACC TTT TTT GGC TTA TAT AAG CTT 537
```

配列番号 : 2 0

配列の長さ : 8 3 4

配列の型：核酸

配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

ATG CAG CAG CCC GTG AAT TAC CCA TGT CCC CAG ATC TAC TGG GTA 45
GAC AGC AGT GCC ACT TCT CCT TGG GCT CCT CCA GGG TCA GTT TTT 90
TCT TGT CCA TCC TCT GGG CCT AGA GGG CCA GGA CAA AGG AGA CCA 135
CCG CCT CCA CCA CCA CCT CCA TCA CCA CTA CCA CCG CCT TCC CAA 180
CCA CCC CCG CTG CCT CCA CTA AGC CCT CTA AAG AAG AAG GAC AAC 225
ATA GAG CTG TGG CTA CCG GTG ATA TTT TTC ATG GTG CTG GTG GCT 270
CTG GTT GGA ATG GGG TTA GGA ATG TAT CAA CTC TTT CAT CTA CAG 315
AAG GAA CTG GCA GAA CTC CGT GAG TTC ACC AAC CAC AGC CTT AGA 360
GTA TCA TCT TTT GAA AAG CAA ATA GCC AAC CCC AGC ACA CCC TCT 405
GAA ACC AAA AAG CCA AGG AGT GTG GCC CAC TTA ACA GGG AAC CCC 450
CGC TCA AGG TCC ATC CCT CTG GAA TGG GAA GAC ACA TAT GGA ACT 495
GCT TTG ATC TCT GGA GTG AAG TAT AAG AAA GGC GGC CTT GTG ATC 540
AAT GAG GCT GGG TTG TAC TTC GTA TAT TCC AAA GTA TAC TTC CGG 585
GGT CAG TCT TGC AAC AGC CAG CCC CTA AGC CAC AAG GTC TAT ATG 630
AGG AAC TTT AAG TAT CCT GGG GAT CTG GTG CTA ATG GAG GAG AAG 675
AAG TTG AAT TAC TGC ACT ACT GGC CAG ATA TGG GCC CAC AGC AGC 720
TAC CTA GGG GCA GTA TTT AAT CTT ACC GTT GCT GAC CAT TTA TAT 765
GTC AAC ATA TCT CAA CTC TCT CTG ATC AAT TTT GAG GAA TCT AAG 810
ACC TTT TTT GGC TTA TAT AAG CTT 834

配列番号 : 2 1

配列の数 : 4 1 1

配列の種類 : 核酸

配列の型 : cDNA t o mRNA

配列 :

```
AGT GTG GCC CAT TTA ACA GGG AAC CCC CAC TCA AGG TCC ATC CCT   45
CTG GAA TGG GAA GAC ACA TAT GGA ACC GCT CTG ATC TCT GGA GTG   90
AAG TAT AAG AAA GGT GGC CTT GTG ATC AAC GAA ACT GGG TTG TAC  135
TTC GTG TAT TCC AAA GTA TAC TTC CGG GGT CAG TCT TGC AAC AAC  180
CAG CCC CTA AAC CAC AAG GTC TAT ATG AGG AAC TCT AAG TAT CCT  225
GAG GAT CTG GTG CTA ATG GAG GAG AAG AGG TTG AAC TAC TGC ACT  270
ACT GGA CAG ATA TGG GCC CAC AGC AGC TAC CTG GGG GCA GTA TTC  315
AAT CTT ACC AGT GCT GAC CAT TTA TAT GTC AAC ATA TCT CAA CTC  360
TCT CTG ATC AAT TTT GAG GAA TCT AAG ACC TTT TTC GGC TTG TAT  405
AAG CTT                                                                411
```

配列番号 : 2 2

配列の数 : 4 1 4

配列の種類 : 核酸

配列の型 : cDNA t o mRNA

配列 :

AGG AGT GTG GCC CAT TTA ACA GGG AAC CCC CAC TCA AGG TCC ATC 45
CCT CTG GAA TGG GAA GAC ACA TAT GGA ACC GCT CTG ATC TCT GGA 90
GTG AAG TAT AAG AAA GGT GGC CTT GTG ATC AAC GAA ACT GGG TTG 135
TAC TTC GTG TAT TCC AAA GTA TAC TTC CGG GGT CAG TCT TGC AAC 180
AAC CAG CCC CTA AAC CAC AAG GTC TAT ATG AGG AAC TCT AAG TAT 225
CCT GAG GAT CTG GTG CTA ATG GAG GAG AAG AGG TTG AAC TAC TGC 270
ACT ACT GGA CAG ATA TGG GCC CAC AGC AGC TAC CTG GGG GCA GTA 315
TTC AAT CTT ACC AGT GCT GAC CAT TTA TAT GTC AAC ATA TCT CAA 360
CTC TCT CTG ATC AAT TTT GAG GAA TCT AAG ACC TTT TTC GGC TTG 405
TAT AAG CTT 414

配列番号 : 2 3

配列の数 : 5 3 7

配列の種類 : 核酸

配列の型 : cDNA t o mRNA

配列 :

CAG CTC TTC CAC CTG CAG AAG GAA CTG GCA GAA CTC CGT GAG TTC 45
ACC AAC CAA AGC CTT AAA GTA TCA TCT TTT GAA AAG CAA ATA GCC 90
AAC CCC AGT ACA CCC TCT GAA AAA AAA GAG CCG AGG AGT GTG GCC 135
CAT TTA ACA GGG AAC CCC CAC TCA AGG TCC ATC CCT CTG GAA TGG 180
GAA GAC ACA TAT GGA ACC GCT CTG ATC TCT GGA GTG AAG TAT AAG 225
AAA GGT GGC CTT GTG ATC AAC GAA ACT GGG TTG TAC TTC GTG TAT 270

TCC AAA GTA TAC TTC CGG GGT CAG TCT TGC AAC AAC CAG CCC CTA 315
AAC CAC AAG GTC TAT ATG AGG AAC TCT AAG TAT CCT GAG GAT CTG 360
GTG CTA ATG GAG GAG AAG AGG TTG AAC TAC TGC ACT ACT GGA CAG 405
ATA TGG GCC CAC AGC AGC TAC CTG GGG GCA GTA TTC AAT CTT ACC 450
AGT GCT GAC CAT TTA TAT GTC AAC ATA TCT CAA CTC TCT CTG ATC 495
AAT TTT GAG GAA TCT AAG ACC TTT TTC GGC TTG TAT AAG CTT 537

配列番号 : 2 4

配列の長さ : 8 3 7

配列の種類 : 核酸

配列の型 : cDNA to mRNA

配列 :

ATG CAG CAG CCC ATG AAT TAC CCA TGT CCC CAG ATC TTC TGG GTA 45
GAC AGC AGT GCC ACT TCA TCT TGG GCT CCT CCA GGG TCA GTT TTT 90
CCC TGT CCA TCT TGT GGG CCT AGA GGG CCG GAC CAA AGG AGA CCG 135
CCA CCT CCA CCA CCA CCT GTG TCA CCA CTA CCA CCG CCA TCA CAA 180
CCA CTC CCA CTG CCG CCA CTG ACC CCT CTA AAG AAG AAG GAC CAC 225
AAC ACA AAT CTG TGG CTA CCG GTG GTA TTT TTC ATG GTT CTG GTG 270
GCT CTG GTT GGA ATG GGA TTA GGA ATG TAT CAG CTC TTC CAC CTG 315
CAG AAG GAA CTG GCA GAA CTC CGT GAG TTC ACC AAC CAA AGC CTT 360
AAA GTA TCA TCT TTT GAA AAG CAA ATA GCC AAC CCC AGT ACA CCC 405
TCT GAA AAA AAA GAG CCG AGG AGT GTG GCC CAT TTA ACA GGG AAC 450

CCC CAC TCA AGG TCC ATC CCT CTG GAA TGG GAA GAC ACA TAT GGA 495
 ACC GCT CTG ATC TCT GGA GTG AAG TAT AAG AAA GGT GGC CTT GTG 540
 ATC AAC GAA ACT GGG TTG TAC TTC GTG TAT TCC AAA GTA TAC TTC 585
 CGG GGT CAG TCT TGC AAC AAC CAG CCC CTA AAC CAC AAG GTC TAT 630
 ATG AGG AAC TCT AAG TAT CCT GAG GAT CTG GTG CTA ATG GAG GAG 675
 AAG AGG TTG AAC TAC TGC ACT ACT GGA CAG ATA TGG GCC CAC AGC 720
 AGC TAC CTG GGG GCA GTA TTC AAT CTT ACC AGT GCT GAC CAT TTA 765
 TAT GTC AAC ATA TCT CAA CTC TCT CTG ATC AAT TTT GAG GAA TCT 810
 AAG ACC TTT TTC GGC TTG TAT AAG CTT 837

配列番号 : 2 5

配列の長さ : 1 6 2 3

配列の種類 : アミノ酸

配列の型 : cDNA to mRNA

配列 :

TCAGAGTCCT 10
 GTCCTTGACA CTTCAGTCTC CACAAGACTG AGAGGAGGAA ACCCTTTCCT GGGGCTGGGT 70
 GCC ATG CAG CAG CCC GTG AAT TAC CCA TGT CCC CAG ATC TAC TGG GTA 118
 Met Gln Gln Pro Val Asn Tyr Pro Cys Pro Gln Ile Tyr Trp Val
 1 5 10 15
 GAC AGC AGT GCC ACT TCT CCT TGG GCT CCT CCA GGG TCA GTT TTT TCT 166
 Asp Ser Ser Ala Thr Ser Pro Trp Ala Pro Pro Gly Ser Val Phe Ser

20	25	30	
TGT CCA TCC TCT GGG CCT AGA GGG CCA GGA CAA AGG AGA CCA CCG CCT			214
Cys Pro Ser Ser Gly Pro Arg Gly Pro Gly Gln Arg Arg Pro Pro Pro			
35	40	45	
CCA CCA CCA CCT CCA TCA CCA CTA CCA CCG CCT TCC CAA CCA CCC CCG			262
Pro Pro Pro Pro Pro Ser Pro Leu Pro Pro Pro Ser Gln Pro Pro Pro			
50	55	60	
CTG CCT CCA CTA AGC CCT CTA AAG AAG AAG GAC AAC ATA GAG CTG TGG			310
Leu Pro Pro Leu Ser Pro Leu Lys Lys Lys Asp Asn Ile Glu Leu Trp			
65	70	75	
CTA CCG GTG ATA TTT TTC ATG GTG CTG GTG GCT CTG GTT GGA ATG GGG			358
Leu Pro Val Ile Phe Phe Met Val Leu Val Ala Leu Val Gly Met Gly			
80	85	90	95
TTA GGA ATG TAT CAA CTC TTT CAT CTA CAG AAG GAA CTG GCA GAA CTC			406
Leu Gly Met Tyr Gln Leu Phe His Leu Gln Lys Glu Leu Ala Glu Leu			
100	105	110	
CGT GAG TTC ACC AAC CAC AGC CTT AGA GTA TCA TCT TTT GAA AAG CAA			454
Arg Glu Phe Thr Asn His Ser Leu Arg Val Ser Ser Phe Glu Lys Gln			
115	120	125	
ATA GCC AAC CCC AGC ACA CCC TCT GAA ACC AAA AAG CCA AGG AGT GTG			502
Ile Ala Asn Pro Ser Thr Pro Ser Glu Thr Lys Lys Pro Arg Ser Val			
130	135	140	

GCC CAC TTA ACA GGG AAC CCC CGC TCA AGG TCC ATC CCT CTG GAA TGG 550
 Ala His Leu Thr Gly Asn Pro Arg Ser Arg Ser Ile Pro Leu Glu Trp
 145 150 155
 GAA GAC ACA TAT GGA ACT GCT TTG ATC TCT GGA GTG AAG TAT AAG AAA 598
 Glu Asp Thr Tyr Gly Thr Ala Leu Ile Ser Gly Val Lys Tyr Lys Lys
 160 165 170 175
 GGC GGC CTT GTG ATC AAT GAG GCT GGG TTG TAC TTC GTA TAT TCC AAA 646
 Gly Gly Leu Val Ile Asn Glu Ala Gly Leu Tyr Phe Val Tyr Ser Lys
 180 185 190
 GTA TAC TTC CGG GGT CAG TCT TGC AAC AGC CAG CCC CTA AGC CAC AAG 694
 Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn Ser Gln Pro Leu Ser His Lys
 195 200 205
 GTC TAT ATG AGG AAC TTT AAG TAT CCT GGG GAT CTG GTG CTA ATG GAG 742
 Val Tyr Met Arg Asn Phe Lys Tyr Pro Gly Asp Leu Val Leu Met Glu
 210 215 220
 GAG AAG AAG TTG AAT TAC TGC ACT ACT GGC CAG ATA TGG GCC CAC AGC 790
 Glu Lys Lys Leu Asn Tyr Cys Thr Thr Gly Gln Ile Trp Ala His Ser
 225 230 235
 AGC TAC CTA GGG GCA GTA TTT AAT CTT ACC GTT GCT GAC CAT TTA TAT 838
 Ser Tyr Leu Gly Ala Val Phe Asn Leu Thr Val Ala Asp His Leu Tyr
 240 245 250 255
 GTC AAC ATA TCT CAA CTC TCT CTG ATC AAT TTT GAG GAA TCT AAG ACC 886

Val Asn Ile Ser Gln Leu Ser Leu Ile Asn Phe Glu Glu Ser Lys Thr

260

265

270

TTT TTT GGC TTA TAT AAG CTT TAAAGGAAAA AGCATTTTAG AATGATCTAT 937

Phe Phe Gly Leu Tyr Lys Leu

275

278

TATTCTTTAT CATGGATGCC AGGAATATTG TCTTCAATGA GAGTCTTCTT AAGACCAATT 997

GAGCCACAAA GACCACAAGG TCCAACAGGT CAGCTACCCT TCATTTTCTA GAGGTCCATG 1057

GAGTGGTCCT TAATGCCTGC ATCATGAGCC AGATGGGAAG AAGACTGTTC CTGAGGAACA 1117

TAAAGTTTTG GGCTGCTGTG TGGCAATGCA GAGGCAAAGA GAAGGAACTG TCTGATGTTA 1177

AATGGCCAAG AGCATTTTAG CCATTGAAGA AAAAAAAAC CTTTAACTC ACCTTCCAGG 1237

GTGGGTCTAC TTGCTACCTC ACAGGAGGCC GTCTTTTAGA CACATGGTTG TGGTATGACT 1297

ATACAAGGGT GAGAAAGGAT GCTAGCTTTC ATGGATAAGC TAGAGACTGA AAAAAGCCAG 1357

TGTCCCATTTG GCATCATCTT TATTTTAAAC TGATGTTTTT TGAGCCCACC TTTGATGCTA 1417

ACAGAGAAAT AAGAGGGGTG TTTGAGGCAC AAGTCATTCT CTACATAGCA TGTGTACCTC 1477

CAGTGCAATG ATGTCTGTGT GTGTTTTTAT GTATGAGAGT AGAGCGATTC TAAAGAGTCA 1537

CATGAGTACA ACGCGTACAT TACGGAGTAC ATATTAGAAA CGTATGTGTT ACATTTGATG 1597

CTAGAATATC TGAATGTTTC TTGCTA 1623

配列番号 : 2 6

配列の長さ : 4 2 6

配列の種類 : アミノ酸

配列の型 : タンパク質

配列：

	GATTTATTTC AGGC	14
AAG TCC AAC TCA AGG TCC ATG CCT CTG GAA TGG GAA GAC ACC TAT		59
Lys Ser Asn Ser Arg Ser Met Pro Leu Glu Trp Glu Asp Thr Tyr		
5	10	15
GGA ATT GTC CTG CTT TCT GGA GTG AAG TAT AAG AAG GGT GCC CTT		104
Gly Ile Val Leu Leu Ser Gly Val Lys Tyr Lys Lys Gly Gly Leu		
20	25	30
GTG ATC AAT GAA ACT GGG CTG TAC TTT GTA TAT TCC AAA GTA TAC		149
Val Ile Asn Glu Thr Gly Leu Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Val Tyr		
35	40	45
TTC CGG GGT CAA TCT TGC AAC AAC CTG CCC CTG AGC CAC AAG GTC		194
Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn Asn Leu Pro Leu Ser His Lys Val		
50	55	60
TAC ATG AGG AAC TCT AAG TAT CCC CAG GAT CTG GTG ATG ATG GAG		239
Tyr Met Arg Asn Ser Lys Tyr Pro Gln Asp Leu Val Met Met Glu		
65	70	75
GGG AAG ATG ATG AGC TAC TGC ACT ACT GGG CAG ATG TGG GCC CGC		284
Gly Lys Met Met Ser Tyr Cys Thr Thr Gly Gln Met Trp Ala Arg		
80	85	90
AGC AGC TAC CTG GGG GCA GTG TTC AAT CTT ACC ACT GCT GAT CAT		329
Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Val Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp His		

95	100	105	
TTA TAT GTC AAC GTA TCT GAG CTC TCT CTG GTC AAT TTT GAG GAA 374			
Leu Tyr Val Asn Val Ser Glu Leu Ser Leu Val Asn Phe Glu Glu			
110	115	120	
TCT CAG ACG TTT TTC GGC TTA TAT AAG CTC TAA GAGAAGCACT 417			
Ser Gln Thr Phe Phe Gly Leu Tyr Lys Leu			
125	130		
TTGGGATTC			426

配列番号 : 2 7

配列の長さ : 2 4 3 3

配列の種類 : 核酸

配列の型 : 他の核酸

配列 :

AATTATAATG TATAAAAAAG CATGCAATTA TAATTCATAA AATTATAGCC CCACTGACCA	60
TTCTCCTGTA GCTGGGAGCA GTTCACACTA ACAGGGCTAT ACCCCCATGC TGACCTGCTC	120
TGCAGGATCC CAGGAAGGTG AGCATAGCCT ACTAACCTGT TTGGGTAGCA CAGCGACAGC	180
AACTGAGGCC TTGAAGGCTG TTATCAGAAA ATTGTGGGCG GAAACTTCCA GGGGTTTGCT	240
CTGAGCTTCT TGAGGCTTCT CAGCTTCAGC TGCAAAGTGA GTGGGTGTTT CTTTGAGAAG	300
CAGAATCAGA GAGAGAGAGA TAGAGAAAGA GAAAGACAGA GGTGTTTCCC TTAGCTATGG	360
AAACTCTATA AGAGAGATCC AGCTTGCCTC CTCTTGAGCA GTCAGCAACA GGGTCCCGTC	420
CTTGACACCT CAGCCTCTAC AGGACTGAGA AGAACTAAAA CCGTTTGCTG GGGCTGCGCT	480

GA CTC ACC AG CTGCC ATG CAG CAG CCC TTC AAT TAC CCA TAT CCC CAG ATC 531

Met Gln Gln Pro Phe Asn Tyr Pro Tyr Pro Gln Ile

1

5

10

TAC TGG GTG GAC AGC AGT GCC AGC TCT CCC TGG GCC CCT CCA GGC ACA 579

Tyr Trp Val Asp Ser Ser Ala Ser Ser Pro Trp Ala Pro Pro Gly Thr

15

20

25

GTT CTT CCC TGT CCA ACC TCT GTG CCC AGA AGG CCT GGT CAA AGG AGG 627

Val Leu Pro Cys Pro Thr Ser Val Pro Arg Arg Pro Gly Gln Arg Arg

30

35

40

CCA CCA CCA CCA CCG CCA CCG CCA CCA CTA CCA CCT CCG CCG CCG CCG 675

Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro

45

50

55

60

CCA CCA CTG CCT CCA CTA CCG CTG CCA CCC CTG AAG AAG AGA GGG AAC 723

Pro Pro Leu Pro Pro Leu Pro Leu Pro Pro Leu Lys Lys Arg Gly Asn

65

70

75

CAC AGC ACA GGC CTG TGT CTC CTT GTG ATG TTT TTC ATG GTT CTG GTT 771

His Ser Thr Gly Leu Cys Leu Leu Val Met Phe Phe Met Val Leu Val

80

85

90

GCC TTG GTA GGA TTG GGC CTG GGG ATG TTT CAG CTC TTC CAC CTA CAG 819

Ala Leu Val Gly Leu Gly Leu Gly Met Phe Gln Leu Phe His Leu Gln

95

100

105

AAG GAG CTG GCA GAA CTC CGA GAG GTAAGCCTGC CGGCAGACTG CTGTGCCCTG 873

Lys Glu Leu Ala Glu Leu Arg Glu

110

115

GAGGCACCAG GCATAAGGGG ATGGAGGGCC CACTGCCTGG C..... ..GATTCTGC 922

CTCTTTTGCT TAAAGAATTT TATTTTATT ATACATCTTT TCTCTTTCTG TTTTACTAG 982

TCT ACC AGC CAG ATG CAC ACA GCA TCA TCT TTG GAG AAG CAA ATA G 1028

Ser Thr Ser Gln Met His Thr Ala Ser Ser Leu Glu Lys Gln Ile G

120

125

130

GTGAGTCTTT TTTCGCATGT ACATTGAGTT CCCAAAGATG ATCCTCAGCA CAGAACTATG 1088

TTAATGGAAT GCCTTAAATT CTGTCCCACA CTTTGTTTC TGTACACTAT AAGAGGAATT 1148

C..... ..TTCCCA CCAAATAAT AGTTGCTATT TCATTTTAAC ATATATTTTT 1195

CCTCTCTCTA TGATACAG 1213

GC CAC CCC AGT CCA CCC CCT GAA AAA AAG GAG CTG AGG AAA GTG GCC 1260

Iy His Pro Ser Pro Pro Pro Glu Lys Lys Glu Leu Arg Lys Val Ala

135

140

145

CAT TTA ACA G GTCTGTATCT GGAAGGTACA GGTGAGAT.. 1298

His Leu Thr G

150

...CTGCAGG TGAGAAGATG GACCAGATGG TCCCTAAGAT CCTTCCCAAC TTTAGAACTT 1355

TAGAGTTCCT TGGATTTGGC TTTTTCCTTC AGGAAAGGAC TTCAAAGCCT AGCAGATTTG 1415

GTGCTAGTTC TGAAGATACT AAAATCTTTG TTCCAGAGAG CAAATATTTT CTCAATAATT 1475

TCTTACTGCA ATGGATTACG GGTATATACT ATTGTTCCAA TTGTGTGGAT GACAAAATAG 1535

GACAACGTTG TTGAGGAAAT TCTGTGATGG ATCAAGTTCT GACCCCTCAG CCAGTTCTAT 1595

ACCAGCTGTC ATTCTGGGTG AAACATTTGT TGAAGGAAGG GCCCACAGTT TTGCCTTAGA 1655

AACTTAGTTT GTTGGATGCA TGA CTATTCC TTGCTGAAAG CTCCTTTTGG ATTTATTTC A 1715

G GC AAG TCC AAC TCA AGG TCC ATG CCT CTG GAA TGG GAA GAC ACC TAT 1763

ly Lys Ser Asn Ser Arg Ser Met Pro Leu Glu Trp Glu Asp Thr Tyr

155

160

165

GGA ATT GTC CTG CTT TCT GGA GTG AAG TAT AAG AAG GGT GGC CTT GTG 1811

Gly Ile Val Leu Leu Ser Gly Val Lys Tyr Lys Lys Gly Gly Leu Val

170

175

180

ATC AAT GAA ACT GGG CTG TAC TTT GTA TAT TCC AAA GTA TAC TTC CGG 1859

Ile Asn Glu Thr Gly Leu Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Val Tyr Phe Arg

185

190

195

GGT CAA TCT TGC AAC AAC CTG CCC CTG AGC CAC AAG GTC TAC ATG AGG 1907

Gly Gln Ser Cys Asn Asn Leu Pro Leu Ser His Lys Val Tyr Met Arg

200

205

210

AAC TCT AAG TAT CCC CAG GAT CTG GTG ATG ATG GAG GGG AAG ATG ATG 1955

Asn Ser Lys Tyr Pro Gln Asp Leu Val Met Met Glu Gly Lys Met Met

215

220

225

230

AGC TAC TGC ACT ACT GGG CAG ATG TGG GCC CGC AGC AGC TAC CTG GGG 2003

Ser Tyr Cys Thr Thr Gly Gln Met Trp Ala Arg Ser Ser Tyr Leu Gly

235

240

245

GCA GTG TTC AAT CTT ACC AGT GCT GAT CAT TTA TAT GTC AAC GTA TCT 2051

Ala Val Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp His Leu Tyr Val Asn Val Ser

250 255 260
 GAG CTC TCT CTG GTC AAT TTT GAG GAA TCT CAG ACG TTT TTC GGC TTA 2099
 Glu Leu Ser Leu Val Asn Phe Glu Glu Ser Gln Thr Phe Phe Gly Leu
 265 270 275
 TAT AAG CTC TAA GAGAAGCACT TTGGGATTCT TTCCATTATG ATTCTTTGTT 2151
 Tyr Lys Leu
 281
 ACAGGCACCG AGAATGTTGT ATTCAGTGAG GGTCTTCTTA CATGCATTG AGGTCAAGTA 2211
 AGAAGACATG AACCAAGTGG ACCTTGAGAC CACAGGGTTC AAAATGTCTG TAGCTCCTCA 2271
 ACTCACCTAA TGTTTATGAG CCAGACAAAT GGAGGAATAT GACGGAAGAA CATAGAACTC 2231
 TGGGCTGCCA TGTGAAGAGG GAGAAGCATG AAAAAGCAGC TACCAGGTGT TCTACACTCA 2391
 TCTTAGTGCC TGAGAGTATT TAGGCAGATT GAAAAGGACA CC 2433

配列番号 : 2 8

配列の長さ : 1 7 0 7

配列の種類 : 核酸

配列の型 : G e n o m i c DNA

配列 :

CTGCGGAAAC TTTATAAAGA AAACCTAGCT TCTCTGGAGC AGTCAGCGTC AGAGTTCTGT 60
 CCTTGACACC TGAGTCTCCT CCACAAGGCT GTGAGAAGGA AACCCTTTCC TGGGGCTGGG 120
 TGCC ATG CAG CAG CCC ATG AAT TAC CCA TGT CCC CAG ATC TTC TGG GTA 169
 Met Gln Gln Pro Met Asn Tyr Pro Cys Pro Gln Ile Phe Trp Val

1	5	10	15	
GAC AGC AGT GCC ACT TCA TCT TGG GCT CCT CCA GGG TCA GTT TTT CCC	217			
Asp Ser Ser Ala Thr Ser Ser Trp Ala Pro Pro Gly Ser Val Phe Pro				
20	25	30		
TGT CCA TCT TGT GGG CCT AGA GGG CCG GAC CAA AGG AGA CCG CCA CCT	265			
Cys Pro Ser Cys Gly Pro Arg Gly Pro Asp Gln Arg Arg Pro Pro Pro				
35	40	45		
CCA CCA CCA CCT GTG TCA CCA CTA CCA CCG CCA TCA CAA CCA CTC CCA	313			
Pro Pro Pro Pro Val Ser Pro Leu Pro Pro Pro Ser Gln Pro Leu Pro				
50	55	60		
CTG CCG CCA CTG ACC CCT CTA AAG AAG AAG GAC CAC AAC ACA AAT CTG	361			
Leu Pro Pro Leu Thr Pro Leu Lys Lys Lys Asp His Asn Thr Asn Leu				
65	70	75		
TGG CTA CCG GTG GTA TTT TTC ATG GTT CTG GTG GCT CTG GTT GGA ATG	409			
Trp Leu Pro Val Val Phe Phe Met Val Leu Val Ala Leu Val Gly Met				
80	85	90	95	
GGA TTA GGA ATG TAT CAG CTC TTC CAC CTG CAG AAG GAA CTG GCA GAA	457			
Gly Leu Gly Met Tyr Gln Leu Phe His Leu Gln Lys Glu Leu Ala Glu				
100	105	110		
CTC CGT GAG TTC ACC AAC CAA AGC CTT AAA GTA TCA TCT TTT GAA AAG	505			
Leu Arg Glu Phe Thr Asn Gln Ser Leu Lys Val Ser Ser Phe Glu Lys				
115	120	125		

CAA ATA GCC AAC CCC AGT ACA CCC TCT GAA AAA AAA GAG CCG AGG AGT 553
 Gln Ile Ala Asn Pro Ser Thr Pro Ser Glu Lys Lys Glu Pro Arg Ser
 130 135 140
 GTG GCC CAT TTA ACA GGG AAC CCC CAC TCA AGG TCC ATC CCT CTG GAA 601
 Val Ala His Leu Thr Gly Asn Pro His Ser Arg Ser Ile Pro Leu Glu
 145 150 155
 TGG GAA GAC ACA TAT GGA ACC GCT CTG ATC TCT GGA GTG AAG TAT AAG 649
 Trp Glu Asp Thr Tyr Gly Thr Ala Leu Ile Ser Gly Val Lys Tyr Lys
 160 165 170 175
 AAA GGT GGC CTT GTG ATC AAC GAA ACT GGG TTG TAC TTC GTG TAT TCC 697
 Lys Gly Gly Leu Val Ile Asn Glu Thr Gly Leu Tyr Phe Val Tyr Ser
 180 185 190
 AAA GTA TAC TTC CGG GGT CAG TCT TGC AAC AAC CAG CCC CTA AAC CAC 745
 Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn Asn Gln Pro Leu Asn His
 195 200 205
 AAG GTC TAT ATG AGG AAC TCT AAG TAT CCT GAG GAT CTG GTG CTA ATG 793
 Lys Val Tyr Met Arg Asn Ser Lys Tyr Pro Glu Asp Leu Val Leu Met
 210 215 220
 GAG GAG AAG AGG TTG AAC TAC TGC ACT ACT GGA CAG ATA TGG GCC CAC 841
 Glu Glu Lys Arg Leu Asn Tyr Cys Thr Thr Gly Gln Ile Trp Ala His
 225 230 235
 AGC AGC TAC CTG GGG GCA GTA TTC AAT CTT ACC AGT GCT GAC CAT TTA 889

Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Val Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp His Leu

240 245 250 255

TAT GTC AAC ATA TCT CAA CTC TCT CTG ATC AAT TTT GAG GAA TCT AAG 937

Tyr Val Asn Ile Ser Gln Leu Ser Leu Ile Asn Phe Glu Glu Ser Lys

260 265 270

ACC TTT TTC GGC TTG TAT AAG CTT TAA AAGAAAAAGC ATTTTAAAAAT 984

Thr Phe Phe Gly Leu Tyr Lys Leu

275 279

GATCTACTAT TCTTTATCAT GGGCACCAGG AATATTGTCT TGAATGAGAG TCTTCTTAAG 1044

ACCTATTGAG ATTAATTAAG ACTACATGAG CCACAAAGAC CTCATGACCG CAAGGTCCAA 1104

CAGGTCAGCT ATCCTTCATT TTCTCGAGGT CCATGGAGTG GTCCTTAATG CCTGCATCAT 1164

GAGCCAGATG GAAGGAGGTC TGTGACTGAG GGACATAAAG CTTTGGGCTG CTGTGTGACA 1224

ATGCAGAGGC ACAGAGAAAG AACTGTCTGA TGTAAATGG CCAAGAGAAT TTAAACCATT 1284

GAAG----AA GACACCTTTA CACTCA-CTT CCAGGGTGGG TCTACTTACT ACCTCACAG- 1338

AGGCCGTTTT TGAGACATA- -GTTGTGGTA TGAATATACA AGGGTGAGAA AGGAGGCT-C 1395

ATTTGACTGA TAAGCTAGAG ACTGAAAAAA AGACAGTGTC TCATTGGCAC CATCTTTACT 1455

GTTACCTAAT GTTTTCTGAG CCGACCTTTG ATCCTAACGG AGAAGTAAGA GGGATGTTTG 1515

AGGCACAAAT CATTCTCTAC ATAGCATGCA TACCTCCAGT GCAATGATGT CTGTGTGT-- 1573

TTGTATGTAT GAGAGCAAAC AGATTCTAAG GAGTCATATA AATAAAATAT GTACATTATG 1633

GAGTACATAT TAGAAACC-- --TGTTACAT TTGATGCTAG A-TATCTGAA TGTTTCTTGG 1688

CAATAAACTC TAATAGTCT 1707

配列番号 : 2 9

配列の長さ : 9 2 4

配列の種類 : 核酸

配列の型 : 他の核酸、DNA

アンチセンス : y e s

配列 :

```
GAATCCCAAA GTGCTTCTCT TAGAGCTTAT ATAAGCCGAA AAACGTCTGA 50
GATTCCTCAA AATTGACCAG AGAGAGCTCA GATACGTTGA CATATAAATG 100
ATCAGCACTG GTAAGATTGA AACTGCCCC CAGGTAGCTG CTGCGGGCCC 150
ACATCTGCCC AGTAGTGCAG TAGCTCATCA TCTTCCCCTC CATCATCACC 200
AGATCCTGGG GATACTTAGA GTTCCTCATG TAGACCTTGT GGCTCAGGGG 250
CAGGTTGTTG CAAGATTGAC CCCGGAAGTA TACTTTGGAA TATACAAAGT 300
ACAGCCCAGT TTCATTGATC ACAAGGCCAC CCTTCTTATA CTTCACTCCA 350
GAAAGCAGGA CAATTCCATA GGTGTCTTCC CATTCCAGAG GCATGGACCT 400
TGAGTTGGAC TTGCCTGTTA AATGGGCCAC TTTCTCAGC TCCTTTTTTT 450
CAGGGGGTGG ACTGGGGTGG CCTATTTGCT TCTCCAAAGA TGATGCTGTG 500
TGCATCTGGC TGGTAGACTC TCGGAGTTCT GCCAGCTCCT TCTGTAGGTG 550
GAAGAGCTGA AACATCCCCA GGCCCAATCC TACCAAGGCA ACCAGAACCA 600
TGAAAAACAT CACAAGGAGA CACAGGCCTG TGCTGTGGTT CCCTCTCTTC 650
TTCAGGGGTG GCAGCGGTAG TGCAGGCAGT GGTGGCGGCG GCGGCGGAGG 700
TGGTAGTGGT GCGCGTGGCG GTGGTGGTGG TGGCCTCCTT TGACCAGGCC 750
TTCTGGGCAC AGAGGTTGGA CAGGGAAGAA CTGTGCCTGG AGGGGCCAG 800
```

GGAGAGCTGG CACTGCTGTC CACCCAGTAG ATCTGGGGAT ATGGGTAATT 850
GAAGGGCTGC TGCATGGCAG CTGGTGAGTC AGGCCAGCCC CAGCAAACGG 900
TTTTACTTCT TCTCAGTCCT GTAG 924

配列番号 : 3 0

配列の長さ : 9 2 4

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸、RNA

アンチセンス : y e s

配列 :

GAAUCCAAA GUGCUUCUCU UAGAGCUUUAU AUAAGCCGAA AAACGUCUGA 50
GAUUCCUCAA AAUUGACCAG AGAGAGCUCA GAUACGUUGA CAUAUAAAUG 100
AUCAGCACUG GUAAGAUUGA ACACUGCCCC CAGGUAGCUG CUGCGGGCCC 150
ACAUCUGCCC AGUAGUGCAG UAGCUCAUCA UCUUCCCCUC CAUCAUCACC 200
AGAUCUGGG GAUACUUGA GUUCCUCAUG UAGACCUUGU GGCUCAGGGG 250
CAGGUUGUUG CAAGAUUGAC CCCGGAAGUA UACUUUGGAA UAUACAAAGU 300
ACAGCCCAGU UUCAUUGAUC ACAAGGCCAC CCUUCUUAUA CUUCACUCCA 350
GAAAGCAGGA CAAUCCAUA GGUGUCUUC CAUUCAGAG GCAUGGACCU 400
UGAGUUGGAC UUGCCUGUUA AAUGGGCCAC UUCCUCAGC UCCUUUUUU 450
CAGGGGGUGG ACUGGGGUGG CCUAUUUGCU UCUCCAAAGA UGAUGCUGUG 500
UGCAUCUGGC UGGUAGACUC UCGGAGUUCU GCCAGCUCCU UCUGUAGGUG 550
GAAGAGCUGA AACAUCCCA GGGCCAAUCC UACCAAGGCA ACCAGAACCA 600

UGAAAAACAU CACAAGGAGA CACAGGCCUG UGCUGUGGUU CCCUCUCUUC 650
 UUCAGGGGUG GCAGCGGUAG UGGAGGCAGU GGUGGCGGCG GCGGCGGAGG 700
 UGGUAGUGGU GCGGUGGCG GUGGUGGUGG UGGCCUCCUU UGACCAGGCC 750
 UUCUGGGCAC AGAGGUUGGA CAGGGAAGAA CUGUGCCUGG AGGGGCCAG 800
 GGAGAGCUGG CACUGCUGUC CACCCAGUAG AUCUGGGGAU AUGGGUAAUU 850
 GAAGGGCUGC UGCAUGGCAG CUGGUGAGUC AGGCCAGCCC CAGCAAACGG 900
 UUUUACUUCU UCUCAGUCCU GUAG 924

配列番号 : 3 1

配列の長さ : 9 2 4

配列の種類 : 核酸

配列の型 : cDNA t o mRNA

配列 :

CTACAGGACT 10
 GAGAAGAAGT AAAACCGTTT GCTGGGGCTG GCCTGACTCA CCAGCTGCC 59
 ATG CAG CAG CCC TTC AAT TAC CCA TAT CCC CAG ATC TAC TGG GTG 104
 GAC AGC AGT GCC AGC TCT CCC TGG GCC CCT CCA GGC ACA GTT CTT 149
 CCC TGT CCA ACC TCT GTG CCC AGA AGG CCT GGT CAA AGG AGG CCA 194
 CCA CCA CCA CCG CCA CCG CCA CCA CTA CCA CCT CCG CCG CCG CCG 239
 CCA CCA CTG CCT CCA CTA CCG CTG CCA CCC CTG AAG AAG AGA GGG 284
 AAC CAC AGC ACA GGC CTG TGT CTC CTT GTG ATG TTT TTC ATG GTT 329
 CTG GTT GCC TTG GTA GGA TTG GGC CTG GGG ATG TTT CAG CTC TTC 374

CAC CTA CAG AAG GAG CTG GCA GAA CTC CGA GAG TCT ACC AGC CAG 419
ATG CAC ACA GCA TCA TCT TTG GAG AAG CAA ATA GGC CAC CCC AGT 464
CCA CCC CCT GAA AAA AAG GAG CTG AGG AAA GTG GCC CAT TTA ACA 509
GGC AAG TCC AAC TCA AGG TCC ATG CCT CTG GAA TGG GAA GAC ACC 554
TAT GGA ATT GTC CTG CTT TCT GGA GTG AAG TAT AAG AAG GGT GGC 599
CTT GTG ATC AAT GAA ACT GGG CTG TAC TTT GTA TAT TCC AAA GTA 644
TAC TTC CGG GGT CAA TCT TGC AAC AAC CTG CCC CTG AGC CAC AAG 689
GTC TAC ATG AGG AAC TCT AAG TAT CCC CAG GAT CTG GTG ATG ATG 734
GAG GGG AAG ATG ATG AGC TAC TGC ACT ACT GGG CAG ATG TGG GCC 779
CGC AGC AGC TAC CTG GGG GCA GTG TTC AAT CTT ACC AGT GCT GAT 824
CAT TTA TAT GTC AAC GTA TCT GAG CTC TCT CTG GTC AAT TTT GAG 869
GAA TCT CAG ACG TTT TTC GGC TTA TAT AAG CTC TAA GAGAAGCACT 915
TTGGGATTC 924

配列番号 3 2

配列の長さ : 9 2 7

配列の型 : 核酸

配列の種類 : cDNA t o mRNA

配列 :

GAGAAGGA AACCTTTCC TGGGGCTGG GTGCC 32
ATG CAG CAG CCC ATG AAT TAC CCA TGT CCC CAG ATC TTC TGG GTA 77
GAC AGC AGT GCC ACT TCA TCT TGG GCT CCT CCA GGG TCA GTT TTT 122

CCC TGT CCA TCT TGT GGG CCT AGA GGG CCG GAC CAA AGG AGA CCG 167
CCA CCT CCA CCA CCA CCT GTG TCA CCA CTA CCA CCG CCA TCA CAA 212
CCA CTC CCA CTG CCG CCA CTG ACC CCT CTA AAG AAG AAG GAC CAC 257
AAC ACA AAT CTG TGG CTA CCG GTG GTA TTT TTC ATG GTT CTG GTG 302
GCT CTG GTT GGA ATG GGA TTA GGA ATG TAT CAG CTC TTC CAC CTG 347
CAG AAG GAA CTG GCA GAA CTC CGT GAG TTC ACC AAC CAA AGC CTT 392
AAA GTA TCA TCT TTT GAA AAG CAA ATA GCC AAC CCC AGT ACA CCC 437
TCT GAA AAA AAA GAG CCG AGG AGT GTG GCC CAT TTA ACA GGG AAC 482
CCC CAC TCA AGG TCC ATC CCT CTG GAA TGG GAA GAC ACA TAT GGA 527
ACC GCT CTG ATC TCT GGA GTG AAG TAT AAG AAA GGT GGC CTT GTG 572
ATC AAC GAA ACT GGG TTG TAC TTC GTG TAT TCC AAA GTA TAC TTC 617
CGG GGT CAG TCT TGC AAC AAC CAG CCC CTA AAC CAC AAG GTC TAT 662
ATG AGG AAC TCT AAG TAT CCT GAG GAT CTG GTG CTA ATG GAG GAG 707
AAG AGG TTG AAC TAC TGC ACT ACT GGA CAG ATA TGG GCC CAC AGC 752
AGC TAC CTG GGG GCA GTA TTC AAT CTT ACC AGT GCT GAC CAT TTA 797
TAT GTC AAC ATA TCT CAA CTC TCT CTG ATC AAT TTT GAG GAA TCT 842
AAG ACC TTT TTC GGC TTG TAT AAG CTT TAA AAGAAAAAGC ATTTTAAAT 892
GATCTACTAT TCTTTATCAT GGGCACCAGG AATAT 927

配列番号 : 3 3

配列の長さ : 2 0

配列の型 : 核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA（ヌクレオチドプライマー1）

配列：

GATTTTCAACCACTCAGTCG 20

配列番号：34

配列の長さ：37

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA（ヌクレオチドプライマー2）

配列：

ATGCGGCCGCTGGATCCTTTGTATGAAATTGAGTAAT 37

配列番号：35

配列の長さ：24

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA（センスプライマー1）

配列：

ATGCCCAAGTGACTGACATCAACT 24

配列番号：36

配列の長さ：50

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA（アンチセンスプライマー1）

配列：

CGCGGATCCAGGAAGTGGGAAAGGATTACCTTCCTCTTTGCACTTGGTG 50

配列番号：37

配列の長さ：10

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 コザックにより提唱された配列

配列：

CCA/GCCATGG 10

配列番号：38

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA（センスプライマー2）

配列：

AAGACCACAAGGTCCAACAG 20

配列番号：39

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA（センスプライマー3）

配列：

GGTGAGAAAGGATGCTAGGT 20

配列番号 : 4 0

配列の長さ : 2 0

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA (アンチセンスプライマー 2)

配列 :

CATGGATAAGCTAGAGACTG 20

配列番号 : 4 1

配列の長さ : 2 0

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA (アンチセンスプライマー 3)

配列 :

GTACAACGCGTACATTACGG 20

配列番号 : 4 2

配列の長さ : 9 2 5

配列の型 : 核酸

配列の種類 : G e n o m i c DNA

配列 :

AGGAGGAA ACCCTTTCCT GGGGCTGGGT 28

GCC ATG CAG CAG CCC GTG AAT TAC CCA TGT CCC CAG ATC TAC TGG GTA 76
GAC AGC AGT GCC ACT TCT CCT TGG GCT CCT CCA GGG TCA GTT TTT TCT 124
TGT CCA TCC TCT GGG CCT AGA GGG CCA GGA CAA AGG AGA CCA CCG CCT 172
CCA CCA CCA CCT CCA TCA CCA CTA CCA CCG CCT TCC CAA CCA CCC CCG 220
CTG CCT CCA CTA AGC CCT CTA AAG AAG AAG GAC AAC ATA GAG CTG TGG 268
CTA CCG GTG ATA TTT TTC ATG GTG CTG GTG GCT CTG GTT GGA ATG GGG 316
TTA GGA ATG TAT CAA CTC TTT CAT CTA CAG AAG GAA CTG GCA GAA CTC 364
CGT GAG TTC ACC AAC CAC AGC CTT AGA GTA TCA TCT TTT GAA AAG CAA 412
ATA GCC AAC CCC AGC ACA CCC TCT GAA ACC AAA AAG CCA AGG AGT GTG 460
GCC CAC TTA ACA GGG AAC CCC CGC TCA AGG TCC ATC CCT CTG GAA TGG 508
GAA GAC ACA TAT GGA ACT GCT TTG ATC TCT GGA GTG AAG TAT AAG AAA 556
GGC GGC CTT GTG ATC AAT GAG GCT GGG TTG TAC TTC GTA TAT TCC AAA 604
GTA TAC TTC CGG GGT CAG TCT TGC AAC AGC CAG CCC CTA AGC CAC AAG 652
GTC TAT ATG AGG AAC TTT AAG TAT CCT GGG GAT CTG GTG CTA ATG GAG 700
GAG AAG AAG TTG AAT TAC TGC ACT ACT GGC CAG ATA TGG GCC CAC AGC 748
AGC TAC CTA GGG GCA GTA TTT AAT CTT ACC GTT GCT GAC CAT TTA TAT 796
GTC AAC ATA TCT CAA CTC TCT CTG ATC AAT TTT GAG GAA TCT AAG ACC 844
TTT TTT GGC TTA TAT AAG CTT TAAAGGAAAA AGCATTTTAG AATGATCTAT 895
TATTCTTTAT CATGGATGCC AGGAATATTG 925

配列番号 : 4 3

配列の長さ : 2 0

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA（センスプライマー 4）

配列：

AGAACTCCGTGAGTTCACCA 20

配列番号：4 4

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA（アンチセンスプライマー 4）

配列：

CAATATTCCTGGCATCCATG 20

配列番号：4 5

配列の長さ：5 6 8

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸（プローブ 1）

配列：

A GAA CTC 7

CGT GAG TTC ACC AAC CAC AGC CTT AGA GTA TCA TCT TTT GAA AAG CAA 55

ATA GCC AAC CCC AGC ACA CCC TCT GAA ACC AAA AAG CCA AGG AGT GTG 103

GCC CAC TTA ACA GGG AAC CCC CGC TCA AGG TCC ATC CCT CTG GAA TGG 151

GAA GAC ACA TAT GGA ACT GCT TTG ATC TCT GGA GTG AAG TAT AAG AAA 199

GGC GGC CTT GTG ATC AAT GAG GCT GGG TTG TAC TTC GTA TAT TCC AAA 247
 GTA TAC TTC CGG GGT CAG TCT TGC AAC AGC CAG CCC CTA AGC CAC AAG 295
 GTC TAT ATG AGG AAC TTT AAG TAT CCT GGG GAT CTG GTG CTA ATG GAG 343
 GAG AAG AAG TTG AAT TAC TGC ACT ACT GGC CAG ATA TGG GCC CAC AGC 391
 AGC TAC CTA GGG GCA GTA TTT AAT CTT ACC GTT GCT GAC CAT TTA TAT 439
 GTC AAC ATA TCT CAA CTC TCT CTG ATC AAT TTT GAG GAA TCT AAG ACC 487
 TTT TTT GGC TTA TAT AAG CTT TAAAGGAAAA AGCATTTTAG AATGATCTAT 538
 TATTCTTTAT CATGGATGCC AGGAATATTG 568

配列番号 : 4 6

配列の長さ : 1 9 1

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 (プローブ 2)

配列 :

AGGAGGAA ACCCTTTCCT GGGGCTGGGT 28
 GCC ATG CAG CAG CCC GTG AAT TAC CCA TGT CCC CAG ATC TAC TGG GTA 76
 GAC AGC AGT GCC ACT TCT CCT TGG GCT CCT CCA GGG TCA GTT TTT TCT 124
 TGT CCA TCC TCT GGG CCT AGA GGG CCA GGA CAA AGG AGA CCA CCG CCT 172
 CCA CCA CCA CCT CCA TCA C 191

配列番号 : 4 7

配列の長さ : 4 4 4

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸（プローブ3）

配列：

```
CGC TCA AGG TCC ATC CCT CTG GAA TGG      27
GAA GAC ACA TAT GGA ACT GCT TTG ATC TCT GGA GTG AAG TAT AAG AAA      75
GGC GGC CTT GTG ATC AAT GAG GCT GGG TTG TAC TTC GTA TAT TCC AAA     123
GTA TAC TTC CGG GGT CAG TCT TGC AAC AGC CAG CCC CTA AGC CAC AAG     171
GTC TAT ATG AGG AAC TTT AAG TAT CCT GGG GAT CTG GTG CTA ATG GAG     219
GAG AAG AAG TTG AAT TAC TGC ACT ACT GGC CAG ATA TGG GCC CAC AGC     267
AGC TAC CTA GGG GCA GTA TTT AAT CTT ACC GTT GCT GAC CAT TTA TAT     315
GTC AAC ATA TCT CAA CTC TCT CTG ATC AAT TTT GAG GAA TCT AAG ACC     363
TTT TTT GGC TTA TAT AAG CTT TAAAGGAAAA AGCATTTTATG AATGATCTAT     414
TATTCTTTAT CATGGATGCC AGGAATATTG      444
```

配列番号：48

配列の長さ：28

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA（センスプライマー5）

配列：

```
GCTCTAGACTACAGGACTGAGAAGAAGT 28
```

配列番号：49

配列の長さ : 2 8

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA (アンチセンスプライマー 5)

配列 :

GCTCTAGAACATTCTCGGTGCCTGTAAC 28

配列番号 : 5 0

配列の長さ : 2 8

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA (センスプライマー 6)

配列 :

GCTCTAGAGAGAAGGAAACCCTTTCCTG 28

配列番号 : 5 1

配列の長さ : 2 8

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA (アンチセンスプライマー 6)

配列 :

GCTCTAGAATATTCCTGGTGCCCATGAT 28

配列番号 : 5 2

配列の長さ : 1 1

配列の型：アミノ酸

配列の種類：ペプチド ペプチド①

配列：

Leu Val Met Met Glu Gly Lys Met Met Ser Tyr

1 5 11

配列番号：5 3

配列の長さ：2 0

配列の型：アミノ酸

配列の種類：ペプチド ペプチド②

配列：

Lys Ser Asn Ser Arg Ser Met Pro Leu Glu Trp Glu Asp Thr Tyr

1 5 10 15

Gly Ile Val Leu Leu

20

配列番号：5 4

配列の長さ：1 6

配列の型：アミノ酸

配列の種類：ペプチド ペプチド③

配列：

Ser Lys Tyr Pro Gln Asp Leu Val Met Met Glu Gly Lys Met Met Ser

1 5 10 15 16

配列番号 : 5 5

配列の長さ : 1 3

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド ペプチド④

配列 :

Leu Ser Leu Val Asn Phe Glu Glu Ser Gln Thr Phe Phe

1 5 10 13

配列番号 : 5 6

配列の長さ : 2 4

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA (センスプライマー 7)

配列 :

CACCTGCAGAAGGAGCTGGCAGAA 24

配列番号 : 5 7

配列の長さ : 3 3

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA (アンチセンスプライマー 7)

配列 :

AATAAGCTTGGTACCCTATTAGAGCTTATATAA 33

配列番号 : 5 8

配列の長さ : 2 7

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA (センスプライマー 8)

配列 :

TGCGAATTCACCATGCTGGGCATCTGG 27

配列番号 : 5 9

配列の長さ : 3 6

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA (アンチセンスプライマー 8)

配列 :

AACCTGCAGGTGGAAGAGCTGAGCAACAGACGTAAG 36

配列番号 : 6 0

配列の長さ : 1 5

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Pro Ser Pro Pro Pro Glu Lys Lys Glu Leu Arg Lys Val Ala His

1 5 10 15

配列番号： 6 1

配列の長さ： 2 2

配列の型： 核酸

配列の種類： 他の核酸 合成ホスホロチオエート（P S）型

センスオリゴヌクレオチド S 2 0

配列：

TAAAACCGTTTGCTGGGGCTGG 22

配列番号： 6 2

配列の長さ： 2 2

配列の型： 核酸

配列の種類： 他の核酸 合成ホスホロチオエート（P S）型

アンチセンスオリゴヌクレオチド A 4 1

配列：

CCAGCCCCAGCAAACGGTTTTA 22

配列番号： 6 3

配列の長さ： 2 0

配列の型： 核酸

配列の種類： 他の核酸 合成 P S 型センスオリゴヌクレオチド S 5 0

配列：

ACCAGCTGCCATGCAGCAGC 20

配列番号：64

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成PS型アンチセンスヌクレオチドA69

配列：

GCTGCTGCATGGCAGCTGGT 20

配列番号：65

配列の長さ：22

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成PS型センスオリゴヌクレオチドS163

配列：

CTGTGCCCAGAAGGCCTGGTCA 22

配列番号：66

配列の長さ：22

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成PS型アンチセンスオリゴヌクレオチドA184

配列：

TGACCAGGCCTTCTGGGCACAG 22

配列番号 : 6 7

配列の長さ : 1 8

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成P S型センスオリゴヌクレオチドS 3 3 8

配列 :

CTTGGTAGGATTGGGCCT 18

配列番号 : 6 8

配列の長さ : 1 8

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成P S型アンチセンスオリゴヌクレオチドA 3 5 5

配列 :

AGGCCCAATCCTACCAAG 18

配列番号 : 6 9

配列の長さ : 2 2

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成P S型センスオリゴヌクレオチドS 4 8 4

配列 :

AGCTGAGGAAAGTGGCCCATTT 22

配列番号：70

配列の長さ：22

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成PS型アンチセンスオリゴヌクレオチドA505

配列：

AAATGGGCCACTTTCCTCAGCT 22

配列番号：71

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成PS型センスオリゴヌクレオチドS714

配列：

CCCCAGGATCTGGTGATGAT 20

配列番号：72

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成PS型アンチセンスオリゴヌクレオチドA733

配列：

ATCATCACCAGATCCTGGGG 20

配列番号：73

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成PS型センスオリゴヌクレオチドS905

配列：

AGAGAAGCACTTTGGGATTC 20

配列番号：74

配列の長さ：20

配列の種類：核酸

配列の種類：他の核酸 合成PS型アンチセンスオリゴヌクレオチドA924

配列：

GAATCCCAAAGTGCTTCTCT 20

配列番号：76

配列の長さ：141

配列の型：アミノ酸

配列の種類：ペプチド ND38

配列：

Lys Glu Leu Arg Lys Val Ala His Leu Thr Gly Lys Ser Asn Ser

1

5

10

15

Arg Ser Met Pro Leu Glu Trp Glu Asp Thr Tyr Gly Ile Val Leu

20	25	30
Leu Ser Gly Val Lys Tyr Lys Lys Gly Gly Leu Val Ile Asn Glu		
35	40	45
Thr Gly Leu Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln		
50	55	60
Ser Cys Asn Asn Leu Pro Leu Ser His Lys Val Tyr Met Arg Asn		
65	70	75
Ser Lys Tyr Pro Gln Asp Leu Val Met Met Glu Gly Lys Met Met		
80	85	90
Ser Tyr Cys Thr Thr Gly Gln Met Trp Ala Arg Ser Ser Tyr Leu		
95	100	105
Gly Ala Val Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp His Leu Tyr Val Asn		
110	115	120
Val Ser Glu Leu Ser Leu Val Asn Phe Glu Glu Ser Gln Thr Phe		
125	130	135
Phe Gly Leu Tyr Lys Leu		
140	141	

配列番号 : 7 7

配列の長さ : 1 3 9

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド ND 4 0

配列：

Leu Arg Lys Val Ala His Leu Thr Gly Lys Ser Asn Ser Arg Ser

1 5 10 15

Met Pro Leu Glu Trp Glu Asp Thr Tyr Gly Ile Val Leu Leu Ser

20 25 30

Gly Val Lys Tyr Lys Lys Gly Gly Leu Val Ile Asn Glu Thr Gly

35 40 45

Leu Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys

50 55 60

Asn Asn Leu Pro Leu Ser His Lys Val Tyr Met Arg Asn Ser Lys

65 70 75

Tyr Pro Gln Asp Leu Val Met Met Glu Gly Lys Met Met Ser Tyr

80 85 90

Cys Thr Thr Gly Gln Met Trp Ala Arg Ser Ser Tyr Leu Gly Ala

95 100 105

Val Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp His Leu Tyr Val Asn Val Ser

110 115 120

Glu Leu Ser Leu Val Asn Phe Glu Glu Ser Gln Thr Phe Phe Gly

125 130 135

Leu Tyr Lys Leu

139

配列番号 : 7 8

配列の長さ : 1 3 8

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド ND 4 1

配列 :

Arg Lys Val Ala His Leu Thr Gly Lys Ser Asn Ser Arg Ser Met

1 5 10 15

Pro Leu Glu Trp Glu Asp Thr Tyr Gly Ile Val Leu Leu Ser Gly

20 25 30

Val Lys Tyr Lys Lys Gly Gly Leu Val Ile Asn Glu Thr Gly Leu

35 40 45

Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn

50 55 60

Asn Leu Pro Leu Ser His Lys Val Tyr Met Arg Asn Ser Lys Tyr

65 70 75

Pro Gln Asp Leu Val Met Met Glu Gly Lys Met Met Ser Tyr Cys

80 85 90

Thr Thr Gly Gln Met Trp Ala Arg Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Val

95 100 105

Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp His Leu Tyr Val Asn Val Ser Glu

110 115 120

Leu Ser Leu Val Asn Phe Glu Glu Ser Gln Thr Phe Phe Gly Leu

125

130

135

Tyr Lys Leu

138

配列番号 : 7 9

配列の長さ : 1 3 7

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド ND 4 2

配列 :

Lys Val Ala His Leu Thr Gly Lys Ser Asn Ser Arg Ser Met Pro

1

5

10

15

Leu Glu Trp Glu Asp Thr Tyr Gly Ile Val Leu Leu Ser Gly Val

20

25

30

Lys Tyr Lys Lys Gly Gly Leu Val Ile Asn Glu Thr Gly Leu Tyr

35

40

45

Phe Val Tyr Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn Asn

50

55

60

Leu Pro Leu Ser His Lys Val Tyr Met Arg Asn Ser Lys Tyr Pro

65

70

75

Gln Asp Leu Val Met Met Glu Gly Lys Met Met Ser Tyr Cys Thr

80

85

90

Thr Gly Gln Met Trp Ala Arg Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Val Phe

	95	100	105
Asn	Leu	Thr	Ser
Ala	Asp	His	Leu
Tyr	Val	Asn	Val
Ser	Glu	Leu	
	110	115	120
Ser	Leu	Val	Asn
Phe	Glu	Glu	Ser
Gln	Thr	Phe	Phe
Gly	Leu	Tyr	
	125	130	135
Lys	Leu		
	137		

配列番号 : 8 0

配列の長さ : 1 3 6

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド ND 4 3

配列 :

Val	Ala	His	Leu	Thr	Gly	Lys	Ser	Asn	Ser	Arg	Ser	Met	Pro	Leu
1				5					10				15	
Glu	Trp	Glu	Asp	Thr	Tyr	Gly	Ile	Val	Leu	Leu	Ser	Gly	Val	Lys
				20					25				30	
Tyr	Lys	Lys	Gly	Gly	Leu	Val	Ile	Asn	Glu	Thr	Gly	Leu	Tyr	Phe
				35					40				45	
Val	Tyr	Ser	Lys	Val	Tyr	Phe	Arg	Gly	Gln	Ser	Cys	Asn	Asn	Leu
				50					55				60	
Pro	Leu	Ser	His	Lys	Val	Tyr	Met	Arg	Asn	Ser	Lys	Tyr	Pro	Gln

65	70	75
Asp Leu Val Met Met Glu Gly Lys Met Met Ser Tyr Cys Thr Thr		
80	85	90
Gly Gln Met Trp Ala Arg Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Val Phe Asn		
95	100	105
Leu Thr Ser Ala Asp His Leu Tyr Val Asn Val Ser Glu Leu Ser		
110	115	120
Leu Val Asn Phe Glu Glu Ser Gln Thr Phe Phe Gly Leu Tyr Lys		
125	130	135
Leu		
136		

配列番号 : 8 1

配列の長さ : 1 7 8

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド CD 1 7 9

配列 :

Gln	Leu	Phe	His	Leu	Gln	Lys	Glu	Leu	Ala	Glu	Leu	Arg	Glu	Ser
1				5					10					15
Thr	Ser	Gln	Met	His	Thr	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Lys	Gln	Ile	Gly
				20					25					30
His	Pro	Ser	Pro	Pro	Pro	Glu	Lys	Lys	Glu	Leu	Arg	Lys	Val	Ala

35	40	45
His Leu Thr Gly Lys Ser Asn Ser Arg Ser Met Pro Leu Glu Trp		
50	55	60
Glu Asp Thr Tyr Gly Ile Val Leu Leu Ser Gly Val Lys Tyr Lys		
65	70	75
Lys Gly Gly Leu Val Ile Asn Glu Thr Gly Leu Tyr Phe Val Tyr		
80	85	90
Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn Asn Leu Pro Leu		
95	100	105
Ser His Lys Val Tyr Met Arg Asn Ser Lys Tyr Pro Gln Asp Leu		
110	115	120
Val Met Met Glu Gly Lys Met Met Ser Tyr Cys Thr Thr Gly Gln		
125	130	135
Met Trp Ala Arg Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Val Phe Asn Leu Thr		
140	145	150
Ser Ala Asp His Leu Tyr Val Asn Val Ser Glu Leu Ser Leu Val		
155	160	165
Asn Phe Glu Glu Ser Gln Thr Phe Phe Gly Leu Tyr Lys		
170	175	178

配列番号 : 8 2

配列の長さ : 4 5

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA（アンチセンスプライマー9）

配列：

CTTCTGCAGGTGGAAGAGCTGAGCGACACTAGTCAGAACCAGAGG 45

配列番号：83

配列の長さ：45

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA（センスプライマー9）

配列：

AATTCACCATGCTGGGCATCTGGACCCTCCTACCTCTGGTTCTGA 45

配列番号：84

配列の長さ：45

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA（アンチセンスプライマー10）

配列：

CTAGTCAGAACCAGAGGTAGGAGGGTCCAGATGCCCAGCATGGTG 45

配列番号：85

配列の長さ：30

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA（センスプライマー11）

配列：

CTGACTAGTGTGCTAAGGAGCTGAGGAAA 30

配列番号：86

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA（アンチセンスプライマー11）

配列：

TAAGCCGAAAAACGTCTGAG 20

配列番号：87

配列の長さ：30

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA（センスプライマー12）

配列：

CTGACTAGTGTGCTCTGAGGAAAGTGGCC 30

配列番号：88

配列の長さ：30

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA（センスプライマー13）

配列：

CTGACTAGTGTGCTAGGAAAGTGGCCCAT 30

配列番号：89

配列の長さ：30

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA（センスプライマー14）

配列：

CTGACTAGTGTGCTAAAGTGGCCCATTTA 30

配列番号：90

配列の長さ：30

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA（センスプライマー15）

配列：

CTGACTAGTGTGCTGTGGCCCATTTAACA 30

配列番号：91

配列の長さ：27

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA（アンチセンスプライマー16）

配列：

CTTGGTACCCTATTACTTATATAAGCC 27

配列番号 : 9 2

配列の長さ : 2 0

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA (センスプライマー16)

配列 :

GAGCTACTGCACTACTGGGC 20

配列番号 : 9 3

配列の長さ : 3 9

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA (アンチセンスプライマー17)

配列 :

CGCGGATCCGGTACCTTTTTTGGTAACCGGGGTAAACAG 39

配列番号 : 9 4

配列の長さ : 2 0

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA (センスプライマー17)

配列 :

CGCAAGTTCACGTAAAAAGC 20

配列番号 : 9 5

配列の長さ : 4 6

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA (センスプライマー18)

配列 :

TTGAAGCTTAAAAAGGGTATAAAATAAAATGCAGCTCTTCCACCT 46

配列番号 : 9 6

配列の長さ : 2 9

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA (アンチセンスプライマー18)

配列 :

AAGGTCGACTATTAGAGCTTATATAAGCC 29

配列番号 : 9 7

配列の長さ : 3 0

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA (センスプライマー19)

配列 :

GGGGGTTACCAAAGCCCAGCTCTTCCACCT 30

配列番号 : 9 8

配列の長さ : 2 5

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA (センスプライマー20)

配列 :

CCCGGTTACCAAAGCCAAGGAGCTG 25

配列番号 : 9 9

配列の長さ : 2 0

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA (アンチセンスプライマー20)

配列 :

TAAGCCGAAAAACGTCTGAG 20

配列番号 : 1 0 0

配列の長さ : 9 2 7

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 PCR産物

配列 :

GA GAAGGAAACC CTTTCCTGGG GCTGGGTGCC 32

ATG CAG CAG CCC ATG AAT TAC CCA TGT CCC CAG ATC TTC TGG GTA 77

GAC AGC AGT GCC ACT TCA TCT TGG GCT CCT CCA GGG TCA GTT TTT 122

CCC TGT CCA TCT TGT GGG CCT AGA GGG CCG GAC CAA AGG AGA CCG 167
CCA CCT CCA CCA CCA CCT GTG TCA CCA CTA CCA CCG CCA TCA CAA 212
CCA CTC CCA CTG CCG CCA CTG ACC CCT CTA AAG AAG AAG GAC CAC 257
AAC ACA AAT CTG TGG CTA CCG GTG GTA TTT TTC ATG GTT CTG GTG 302
GCT CTG GTT GGA ATG GGA TTA GGA ATG TAT CAG CTC TTC CAC CTG 347
CAG AAG GAA CTG GCA GAA CTC CGT GAG TTC ACC AAC CAA AGC CTT 392
AAA GTA TCA TCT TTT GAA AAG CAA ATA GCC AAC CCC AGT ACA CCC 437
TCT GAA AAA AAA GAG CCG AGG AGT GTG GCC CAT TTA ACA GGG AAC 482
CCC CAC TCA AGG TCC ATC CCT CTG GAA TGG GAA GAC ACA TAT GGA 527
ACC GCT CTG ATC TCT GGA GTG AAG TAT AAG AAA GGT GGC CTT GTG 572
ATC AAC GAA ACT GGG TTG TAC TTC GTG TAT TCC AAA GTA TAC TTC 617
CGG GGT CAG TCT TGC AAC AAC CAG CCC CTA AAC CAC AAG GTC TAT 662
ATG AGG AAC TCT AAG TAT CCT GAG GAT CTG GTG CTA ATG GAG GAG 707
AAG AGG TTG AAC TAC TGC ACT ACT GGA CAG ATA TGG GCC CAC AGC 752
AGC TAC CTG GGG GCA GTA TTC AAT CTT ACC AGT GCT GAC CAT TTA 797
TAT GTC AAC ATA TCT CAA CTC TCT CTG ATC AAT TTT GAG GAA TCT 842
AAG ACC CTT TTC GGC TTG TAT AAG CTT TAA AAGAAAAAGC ATTTTAAAT 892
GATCTACTAT TCTTTATCAT GGGCACCAGG AATAT 927

請 求 の 範 囲

1. 下記式1（配列表の配列番号1）のアミノ酸配列を含有することを特徴とする新規ポリペプチド。

式1

Lys	Val	Ala	His	Leu	Thr	Gly	Lys	Ser	Asn	
1				5					10	
Ser	Arg	Ser	Met	Pro	Leu	Glu	Trp	Glu	Asp	
				15					20	
Thr	Tyr	Gly	Ile	Val	Leu	Leu	Ser	Gly	Val	
				25					30	
Lys	Tyr	Lys	Lys	Gly	Gly	Leu	Val	Ile	Asn	
				35					40	
Glu	Thr	Gly	Leu	Tyr	Phe	Val	Tyr	Ser	Lys	
				45					50	
Val	Tyr	Phe	Arg	Gly	Gln	Ser	Cys	Asn	Asn	
				55					60	
Leu	Pro	Leu	Ser	His	Lys	Val	Tyr	Met	Arg	
				65					70	
Asn	Ser	Lys	Tyr	Pro	Gln	Asp	Leu	Val	Met	
				75					80	
Met	Glu	Gly	Lys	Met	Met	Ser	Tyr	Cys	Thr	
				85					90	

Thr Gly Gln Met Trp Ala Arg Ser Ser Tyr

95 100

Leu Gly Ala Val Phe Asn Leu Thr Ser Ala

105 110

Asp His Leu Tyr Val Asn Val Ser Glu Leu

115 120

Ser Leu Val Asn Phe Glu Glu Ser Gln Thr

125 130

Phe Phe Gly Leu Tyr Lys Leu

135 137

2. 下記式2（配列表の配列番号2）のアミノ酸配列を含有することを特徴とする新規ポリペプチド。

式2

Arg Lys Val Ala His Leu Thr Gly Lys Ser

1 5 10

Asn Ser Arg Ser Met Pro Leu Glu Trp Glu

15 20

Asp Thr Tyr Gly Ile Val Leu Leu Ser Gly

25 30

Val Lys Tyr Lys Lys Gly Gly Leu Val Ile

35 40

Asn Glu Thr Gly Leu Tyr Phe Val Tyr Ser

				45					50
Lys	Val	Tyr	Phe	Arg	Gly	Gln	Ser	Cys	Asn
				55					60
Asn	Leu	Pro	Leu	Ser	His	Lys	Val	Tyr	Met
				65					70
Arg	Asn	Ser	Lys	Tyr	Pro	Gln	Asp	Leu	Val
				75					80
Met	Met	Glu	Gly	Lys	Met	Met	Ser	Tyr	Cys
				85					90
Thr	Thr	Gly	Gln	Met	Trp	Ala	Arg	Ser	Ser
				95					100
Tyr	Leu	Gly	Ala	Val	Phe	Asn	Leu	Thr	Ser
				105					110
Ala	Asp	His	Leu	Tyr	Val	Asn	Val	Ser	Glu
				115					120
Leu	Ser	Leu	Val	Asn	Phe	Glu	Glu	Ser	Gln
				125					130
Thr	Phe	Phe	Gly	Leu	Tyr	Lys	Leu		
				135					138

3. 下記式3（配列表の配列番号3）のアミノ酸配列を含有することを特徴とする新規ポリペプチド。

式3

Gln	Leu	Phe	His	Leu	Gln	Lys	Glu	Leu	Ala
1				5					10
Glu	Leu	Arg	Glu	Ser	Thr	Ser	Gln	Met	His
				15					20
Thr	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Lys	Gln	Ile	Gly
				25					30
His	Pro	Ser	Pro	Pro	Pro	Glu	Lys	Lys	Glu
				35					40
Leu	Arg	Lys	Val	Ala	His	Leu	Thr	Gly	Lys
				45					50
Ser	Asn	Ser	Arg	Ser	Met	Pro	Leu	Glu	Trp
				55					60
Glu	Asp	Thr	Tyr	Gly	Ile	Val	Leu	Leu	Ser
				65					70
Gly	Val	Lys	Tyr	Lys	Lys	Gly	Gly	Leu	Val
				75					80
Ile	Asn	Glu	Thr	Gly	Leu	Tyr	Phe	Val	Tyr
				85					90
Ser	Lys	Val	Tyr	Phe	Arg	Gly	Gln	Ser	Cys
				95					100
Asn	Asn	Leu	Pro	Leu	Ser	His	Lys	Val	Tyr
				105					110

Met	Arg	Asn	Ser	Lys	Tyr	Pro	Gln	Asp	Leu
				115					120
Val	Met	Met	Glu	Gly	Lys	Met	Met	Ser	Tyr
				125					130
Cys	Thr	Thr	Gly	Gln	Met	Trp	Ala	Arg	Ser
				135					140
Ser	Tyr	Leu	Gly	Ala	Val	Phe	Asn	Leu	Thr
				145					150
Ser	Ala	Asp	His	Leu	Tyr	Val	Asn	Val	Ser
				155					160
Glu	Leu	Ser	Leu	Val	Asn	Phe	Glu	Glu	Ser
				165					170
Gln	Thr	Phe	Phe	Gly	Leu	Tyr	Lys	Leu	
				175					179

4. 下記式4（配列表の配列番号4）のアミノ酸配列を有することを特徴とする新規ポリペプチド。

式4

Met	Gln	Gln	Pro	Phe	Asn	Tyr	Pro	Tyr	Pro
1				5					10
Gln	Ile	Tyr	Trp	Val	Asp	Ser	Ser	Ala	Ser
				15					20
Ser	Pro	Trp	Ala	Pro	Pro	Gly	Thr	Val	Leu

				25					30
Pro	Cys	Pro	Thr	Ser	Val	Pro	Arg	Arg	Pro
				35					40
Gly	Gln	Arg	Arg	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro
				45					50
Pro	Pro	Pro	Leu	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro
				55					60
Pro	Pro	Leu	Pro	Pro	Leu	Pro	Leu	Pro	Pro
				65					70
Leu	Lys	Lys	Arg	Gly	Asn	His	Ser	Thr	Gly
				75					80
Leu	Cys	Leu	Leu	Val	Met	Phe	Phe	Met	Val
				85					90
Leu	Val	Ala	Leu	Val	Gly	Leu	Gly	Leu	Gly
				95					100
Met	Phe	Gln	Leu	Phe	His	Leu	Gln	Lys	Glu
				105					110
Leu	Ala	Glu	Leu	Arg	Glu	Ser	Thr	Ser	Gln
				115					120
Met	His	Thr	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Lys	Gln
				125					130
Ile	Gly	His	Pro	Ser	Pro	Pro	Pro	Glu	Lys

					135					140
Lys	Glu	Leu	Arg	Lys	Val	Ala	His	Leu	Thr	
					145					150
Gly	Lys	Ser	Asn	Ser	Arg	Ser	Met	Pro	Leu	
					155					160
Glu	Trp	Glu	Asp	Thr	Tyr	Gly	Ile	Val	Leu	
					165					170
Leu	Ser	Gly	Val	Lys	Tyr	Lys	Lys	Gly	Gly	
					175					180
Leu	Val	Ile	Asn	Glu	Thr	Gly	Leu	Tyr	Phe	
					185					190
Val	Tyr	Ser	Lys	Val	Tyr	Phe	Arg	Gly	Gln	
					195					200
Ser	Cys	Asn	Asn	Leu	Pro	Leu	Ser	His	Lys	
					205					210
Val	Tyr	Met	Arg	Asn	Ser	Lys	Tyr	Pro	Gln	
					215					220
Asp	Leu	Val	Met	Met	Glu	Gly	Lys	Met	Met	
					225					230
Ser	Tyr	Cys	Thr	Thr	Gly	Gln	Met	Trp	Ala	
					235					240
Arg	Ser	Ser	Tyr	Leu	Gly	Ala	Val	Phe	Asn	

5. 下記式5（配列表の配列番号5）に記載のアミノ酸配列を含有することを特徴とする新規ポリペプチド

式 5

Ser	Val	Ala	His	Leu	Thr	Gly	Asn	Pro	Arg
1				5					10
Ser	Arg	Ser	Ile	Pro	Leu	Glu	Trp	Glu	Asp
				15					20
Thr	Tyr	Gly	Thr	Ala	Leu	Ile	Ser	Gly	Val
				25					30
Lys	Tyr	Lys	Lys	Gly	Gly	Leu	Val	Ile	Asn
				35					40
Glu	Ala	Gly	Leu	Tyr	Phe	Val	Tyr	Ser	Lys
				45					50

Val	Tyr	Phe	Arg	Gly	Gln	Ser	Cys	Asn	Ser
				55					60
Gln	Pro	Leu	Ser	His	Lys	Val	Tyr	Met	Arg
				65					70
Asn	Phe	Lys	Tyr	Pro	Gly	Asp	Leu	Val	Leu
				75					80
Met	Glu	Glu	Lys	Lys	Leu	Asn	Tyr	Cys	Thr
				85					90
Thr	Gly	Gln	Ile	Trp	Ala	His	Ser	Ser	Tyr
				95					100
Leu	Gly	Ala	Val	Phe	Asn	Leu	Thr	Val	Ala
				105					110
Asp	His	Leu	Tyr	Val	Asn	Ile	Ser	Gln	Leu
				115					120
Ser	Leu	Ile	Asn	Phe	Glu	Glu	Ser	Lys	Thr
				125					130
Phe	Phe	Gly	Leu	Tyr	Lys	Leu			
				135		137			

6. 下記式6（配列表の配列番号6）に記載のアミノ酸配列を含有することを特徴とする新規ポリペプチド

式6

Arg Ser Val Ala His Leu Thr Gly Asn Pro

1				5					10
Arg	Ser	Arg	Ser	Ile	Pro	Leu	Glu	Trp	Glu
				15					20
Asp	Thr	Tyr	Gly	Thr	Ala	Leu	Ile	Ser	Gly
				25					30
Val	Lys	Tyr	Lys	Lys	Gly	Gly	Leu	Val	Ile
				35					40
Asn	Glu	Ala	Gly	Leu	Tyr	Phe	Val	Tyr	Ser
				45					50
Lys	Val	Tyr	Phe	Arg	Gly	Gln	Ser	Cys	Asn
				55					60
Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	His	Lys	Val	Tyr	Met
				65					70
Arg	Asn	Phe	Lys	Tyr	Pro	Gly	Asp	Leu	Val
				75					80
Leu	Met	Glu	Glu	Lys	Lys	Leu	Asn	Tyr	Cys
				85					90
Thr	Thr	Gly	Gln	Ile	Trp	Ala	His	Ser	Ser
				95					100
Tyr	Leu	Gly	Ala	Val	Phe	Asn	Leu	Thr	Val
				105					110
Ala	Asp	His	Leu	Tyr	Val	Asn	Ile	Ser	Gln

				115						120
Leu	Ser	Leu	Ile	Asn	Phe	Glu	Glu	Ser	Lys	
				125						130
Thr	Phe	Phe	Gly	Leu	Tyr	Lys	Leu			
				135						138

7. 下記式7（配列表の配列番号7）に記載のアミノ酸配列を含有することを特徴とする新規ポリペプチド。

式7

Gln	Leu	Phe	His	Leu	Gln	Lys	Glu	Leu	Ala
1				5					10
Glu	Leu	Arg	Glu	Phe	Thr	Asn	His	Ser	Leu
				15					20
Arg	Val	Ser	Ser	Phe	Glu	Lys	Gln	Ile	Ala
				25					30
Asn	Pro	Ser	Thr	Pro	Ser	Glu	Thr	Lys	Lys
				35					40
Pro	Arg	Ser	Val	Ala	His	Leu	Thr	Gly	Asn
				45					50
Pro	Arg	Ser	Arg	Ser	Ile	Pro	Leu	Glu	Trp
				55					60
Glu	Asp	Thr	Tyr	Gly	Thr	Ala	Leu	Ile	Ser
				65					70

Gly	Val	Lys	Tyr	Lys	Lys	Gly	Gly	Leu	Val
				75					80
Ile	Asn	Glu	Ala	Gly	Leu	Tyr	Phe	Val	Tyr
				85					90
Ser	Lys	Val	Tyr	Phe	Arg	Gly	Gln	Ser	Cys
				95					100
Asn	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	His	Lys	Val	Tyr
				105					110
Met	Arg	Asn	Phe	Lys	Tyr	Pro	Gly	Asp	Leu
				115					120
Val	Leu	Met	Glu	Glu	Lys	Lys	Leu	Asn	Tyr
				125					130
Cys	Thr	Thr	Gly	Gln	Ile	Trp	Ala	His	Ser
				135					140
Ser	Tyr	Leu	Gly	Ala	Val	Phe	Asn	Leu	Thr
				145					150
Val	Ala	Asp	His	Leu	Tyr	Val	Asn	Ile	Ser
				155					160
Gln	Leu	Ser	Leu	Ile	Asn	Phe	Glu	Glu	Ser
				165					170
Lys	Thr	Phe	Phe	Gly	Leu	Tyr	Lys	Leu	
				175					179

8. 下記式 8 (配列表の配列番号 8) に記載のアミノ酸配列を有することを特徴とする新規ポリペプチド。

式 8

Met	Gln	Gln	Pro	Val	Asn	Tyr	Pro	Cys	Pro	
1				5					10	
Gln	Ile	Tyr	Trp	Val	Asp	Ser	Ser	Ala	Thr	
				15					20	
Ser	Pro	Trp	Ala	Pro	Pro	Gly	Ser	Val	Phe	
				25					30	
Ser	Cys	Pro	Ser	Ser	Gly	Pro	Arg	Gly	Pro	
				35					40	
Gly	Gln	Arg	Arg	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	
				45					50	
Pro	Pro	Ser	Pro	Leu	Pro	Pro	Pro	Ser	Gln	
				55					60	
Pro	Pro	Pro	Leu	Pro	Pro	Leu	Ser	Pro	Leu	
				65					70	
Lys	Lys	Lys	Asp	Asn	Ile	Glu	Leu	Trp	Leu	
				75					80	
Pro	Val	Ile	Phe	Phe	Met	Val	Leu	Val	Ala	
				85					90	
Leu	Val	Gly	Met	Gly	Leu	Gly	Met	Tyr	Gln	

				95					100
Leu	Phe	His	Leu	Gln	Lys	Glu	Leu	Ala	Glu
				105					110
Leu	Arg	Glu	Phe	Thr	Asn	His	Ser	Leu	Arg
				115					120
Val	Ser	Ser	Phe	Glu	Lys	Gln	Ile	Ala	Asn
				125					130
Pro	Ser	Thr	Pro	Ser	Glu	Thr	Lys	Lys	Pro
				135					140
Arg	Ser	Val	Ala	His	Leu	Thr	Gly	Asn	Pro
				145					150
Arg	Ser	Arg	Ser	Ile	Pro	Leu	Glu	Trp	Glu
				155					160
Asp	Thr	Tyr	Gly	Thr	Ala	Leu	Ile	Ser	Gly
				165					170
Val	Lys	Tyr	Lys	Lys	Gly	Gly	Leu	Val	Ile
				175					180
Asn	Glu	Ala	Gly	Leu	Tyr	Phe	Val	Tyr	Ser
				185					190
Lys	Val	Tyr	Phe	Arg	Gly	Gln	Ser	Cys	Asn
				195					200
Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	His	Lys	Val	Tyr	Met

					205					210
Arg	Asn	Phe	Lys	Tyr	Pro	Gly	Asp	Leu	Val	
					215					220
Leu	Met	Glu	Glu	Lys	Lys	Leu	Asn	Tyr	Cys	
					225					230
Thr	Thr	Gly	Gln	Ile	Trp	Ala	His	Ser	Ser	
					235					240
Tyr	Leu	Gly	Ala	Val	Phe	Asn	Leu	Thr	Val	
					245					250
Ala	Asp	His	Leu	Tyr	Val	Asn	Ile	Ser	Gln	
					255					260
Leu	Ser	Leu	Ile	Asn	Phe	Glu	Glu	Ser	Lys	
					265					270
Thr	Phe	Phe	Gly	Leu	Tyr	Lys	Leu			
					275					278

9. 下記式 9 (配列表の配列番号 9) に記載のアミノ酸配列を含有することを特徴とする新規ポリペプチド。

式 9

Ser	Val	Ala	His	Leu	Thr	Gly	Asn	Pro	His
1				5					10
Ser	Arg	Ser	Ile	Pro	Leu	Glu	Trp	Glu	Asp
				15					20

Thr	Tyr	Gly	Thr	Ala	Leu	Ile	Ser	Gly	Val
				25					30
Lys	Tyr	Lys	Lys	Gly	Gly	Leu	Val	Ile	Asn
				35					40
Glu	Thr	Gly	Leu	Tyr	Phe	Val	Tyr	Ser	Lys
				45					50
Val	Tyr	Phe	Arg	Gly	Gln	Ser	Cys	Asn	Asn
				55					60
Gln	Pro	Leu	Asn	His	Lys	Val	Tyr	Met	Arg
				65					70
Asn	Ser	Lys	Tyr	Pro	Glu	Asp	Leu	Val	Leu
				75					80
Met	Glu	Glu	Lys	Arg	Leu	Asn	Tyr	Cys	Thr
				85					90
Thr	Gly	Gln	Ile	Trp	Ala	His	Ser	Ser	Tyr
				95					100
Leu	Gly	Ala	Val	Phe	Asn	Leu	Thr	Ser	Ala
				105					110
Asp	His	Leu	Tyr	Val	Asn	Ile	Ser	Gln	Leu
				115					120
Ser	Leu	Ile	Asn	Phe	Glu	Glu	Ser	Lys	Thr
				125					130

Phe Phe Gly Leu Tyr Lys Leu

135 137

10. 下記式10（配列表の配列番号10）に記載のアミノ酸配列を含有することを特徴とする新規ポリペプチド。

式10

Arg Ser Val Ala His Leu Thr Gly Asn Pro

1 5 10

His Ser Arg Ser Ile Pro Leu Glu Trp Glu

15 20

Asp Thr Tyr Gly Thr Ala Leu Ile Ser Gly

25 30

Val Lys Tyr Lys Lys Gly Gly Leu Val Ile

35 40

Asn Glu Thr Gly Leu Tyr Phe Val Tyr Ser

45 50

Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn

55 60

Asn Gln Pro Leu Asn His Lys Val Tyr Met

65 70

Arg Asn Ser Lys Tyr Pro Glu Asp Leu Val

75 80

Leu Met Glu Glu Lys Arg Leu Asn Tyr Cys

				85					90
Thr	Thr	Gly	Gln	Ile	Trp	Ala	His	Ser	Ser
				95					100
Tyr	Leu	Gly	Ala	Val	Phe	Asn	Leu	Thr	Ser
				105					110
Ala	Asp	His	Leu	Tyr	Val	Asn	Ile	Ser	Gln
				115					120
Leu	Ser	Leu	Ile	Asn	Phe	Glu	Glu	Ser	Lys
				125					130
Thr	Phe	Phe	Gly	Leu	Tyr	Lys	Leu		
				135					138

11. 下記式11（配列表の配列番号11）に記載のアミノ酸配列を含有することを特徴とする新規ポリペプチド。

式11

Gln	Leu	Phe	His	Leu	Gln	Lys	Glu	Leu	Ala
									10
Glu	Leu	Arg	Glu	Phe	Thr	Asn	Gln	Ser	Leu
									20
Lys	Val	Ser	Ser	Phe	Glu	Lys	Gln	Ile	Ala
									30
Asn	Pro	Ser	Thr	Pro	Ser	Glu	Lys	Lys	Glu
									40

Pro Arg Ser Val Ala His Leu Thr Gly Asn

50

Pro His Ser Arg Ser Ile Pro Leu Glu Trp

60

Glu Asp Thr Tyr Gly Thr Ala Leu Ile Ser

70

Gly Val Lys Tyr Lys Lys Gly Gly Leu Val

80

Ile Asn Glu Thr Gly Leu Tyr Phe Val Tyr

90

Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys

100

Asn Asn Gln Pro Leu Asn His Lys Val Tyr

110

Met Arg Asn Ser Lys Tyr Pro Glu Asp Leu

120

Val Leu Met Glu Glu Lys Arg Leu Asn Tyr

130

Cys Thr Thr Gly Gln Ile Trp Ala His Ser

140

Ser Tyr Leu Gly Ala Val Phe Asn Leu Thr

150

Ser Ala Asp His Leu Tyr Val Asn Ile Ser

160

Gln Leu Ser Leu Ile Asn Phe Glu Glu Ser

170

Lys Thr Phe Phe Gly Leu Tyr Lys Leu

179

1 2. 下記式 1 2 (配列表の配列番号 1 2) に記載のアミノ酸配列を有することを特徴とする新規ポリペプチド。

式 1 2

Met Gln Gln Pro Met Asn Tyr Pro Cys Pro

1 5 10

Gln Ile Phe Trp Val Asp Ser Ser Ala Thr

15 20

Ser Ser Trp Ala Pro Pro Gly Ser Val Phe

25 30

Pro Cys Pro Ser Cys Gly Pro Arg Gly Pro

35 40

Asp Gln Arg Arg Pro Pro Pro Pro Pro Pro

45 50

Pro Val Ser Pro Leu Pro Pro Pro Ser Gln

55 60

Pro Leu Pro Leu Pro Pro Leu Thr Pro Leu

				65					70
Lys	Lys	Lys	Asp	His	Asn	Thr	Asn	Leu	Trp
				75					80
Leu	Pro	Val	Val	Phe	Phe	Met	Val	Leu	Val
				85					90
Ala	Leu	Val	Gly	Met	Gly	Leu	Gly	Met	Tyr
				95					100
Gln	Leu	Phe	His	Leu	Gln	Lys	Glu	Leu	Ala
				105					110
Glu	Leu	Arg	Glu	Phe	Thr	Asn	Gln	Ser	Leu
				115					120
Lys	Val	Ser	Ser	Phe	Glu	Lys	Gln	Ile	Ala
				125					130
Asn	Pro	Ser	Thr	Pro	Ser	Glu	Lys	Lys	Glu
				135					140
Pro	Arg	Ser	Val	Ala	His	Leu	Thr	Gly	Asn
				145					150
Pro	His	Ser	Arg	Ser	Ile	Pro	Leu	Glu	Trp
				155					160
Glu	Asp	Thr	Tyr	Gly	Thr	Ala	Leu	Ile	Ser
				165					170
Gly	Val	Lys	Tyr	Lys	Lys	Gly	Gly	Leu	Val

					175					180
Ile	Asn	Glu	Thr	Gly	Leu	Tyr	Phe	Val	Tyr	
					185					190
Ser	Lys	Val	Tyr	Phe	Arg	Gly	Gln	Ser	Cys	
					195					200
Asn	Asn	Gln	Pro	Leu	Asn	His	Lys	Val	Tyr	
					205					210
Met	Arg	Asn	Ser	Lys	Tyr	Pro	Glu	Asp	Leu	
					215					220
Val	Leu	Met	Glu	Glu	Lys	Arg	Leu	Asn	Tyr	
					225					230
Cys	Thr	Thr	Gly	Gln	Ile	Trp	Ala	His	Ser	
					235					240
Ser	Tyr	Leu	Gly	Ala	Val	Phe	Asn	Leu	Thr	
					245					250
Ser	Ala	Asp	His	Leu	Tyr	Val	Asn	Ile	Ser	
					255					260
Gln	Leu	Ser	Leu	Ile	Asn	Phe	Glu	Glu	Ser	
					265					270
Lys	Thr	Phe	Phe	Gly	Leu	Tyr	Lys	Leu		
					275					279

1 3. 前記式 1、5 および 9（配列表の配列番号 1、5 および 9）から選ばれる

いずれかのアミノ酸配列をコードする塩基配列の相補鎖とハイブリダイズする塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を有することを特徴とする新規ポリペプチド。

14. 配列表の配列番号13、17および21から選ばれるいずれかの塩基配列の相補鎖とハイブリダイズする塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を有することを特徴とする新規ポリペプチド。

15. Fas抗原に結合する請求項1ないし14いずれかに記載のポリペプチド。

16. Fas抗原を発現する細胞に対してアポトーシスを誘導する活性を有する請求項1ないし15いずれかに記載のポリペプチド。

17. 組換え型ポリペプチドである請求項1ないし16いずれかに記載の新規ポリペプチド。

18. 前記式4（配列表の配列番号4）に記載のアミノ酸配列の一部分からなるポリペプチド。

19. 前記式8（配列表の配列番号8）に記載のアミノ酸配列の一部分からなるポリペプチド。

20. 前記式12（配列表の配列番号12）に記載のアミノ酸配列の一部分からなるポリペプチド。

21. 前記式4、8および12（配列表の配列番号4、8、12）から選ばれるいずれかのアミノ酸配列の一部または全部からなるポリペプチドが2種以上融合してなるポリペプチド。

22. Fas抗原と結合する請求項18ないし21いずれかに記載のポリペプチ

ド。

23. 請求項1ないし22いずれかに記載の新規ポリペプチドをコードする塩基配列を含有することを特徴とする新規DNA。

24. 前記DNAが、下記式13（配列表の配列番号13）に記載の塩基配列を含有する請求項23に記載の新規DNA。

式13

AAA GTG GCC CAT TTA ACA GGC AAG TCC AAC

30

TCA AGG TCC ATG CCT CTG GAA TGG GAA GAC

60

ACC TAT GGA ATT GTC CTG CTT TCT GGA GTG

90

AAG TAT AAG AAG GGT GGC CTT GTG ATC AAT

120

GAA ACT GGG CTG TAC TTT GTA TAT TCC AAA

150

GTA TAC TTC CGG GGT CAA TCT TGC AAC AAC

180

CTG CCC CTG AGC CAC AAG GTC TAC ATG AGG

210

AAC TCT AAG TAT CCC CAG GAT CTG GTG ATG

240

ATG GAG GGG AAG ATG ATG AGC TAC TGC ACT

270

ACT GGG CAG ATG TGG GCC CGC AGC AGC TAC

300

CTG GGG GCA GTG TTC AAT CTT ACC AGT GCT

330

GAT CAT TTA TAT GTC AAC GTA TCT GAG CTC

360

TCT CTG GTC AAT TTT GAG GAA TCT CAG ACC

390

TTT TTC GGC TTA TAT AAG CTC

411

25. 前記DNAが、下記式14（配列表の配列番号14）に記載の塩基配列を含有する請求項23に記載の新規DNA。

式14

AGG AAA GTG GCC CAT TTA ACA GGC AAG TCC

30

AAC TCA AGG TCC ATG CCT CTG GAA TGG GAA

60

GAC ACC TAT GGA ATT GTC CTG CTT TCT GGA

90

GTG AAG TAT AAG AAG GGT GGC CTT GTG ATC

120

AAT GAA ACT GGG CTG TAC TTT GTA TAT TCC

150

AAA GTA TAC TTC CGG GGT CAA TCT TGC AAC

180

AAC CTG CCC CTG AGC CAC AAG GTC TAC ATG

210

AGG AAC TCT AAG TAT CCC CAG GAT CTG GTG

240

ATG ATG GAG GGG AAG ATG ATG AGC TAC TGC

270

ACT ACT GGG CAG ATG TGG GCC CGC AGC AGC

300

TAC CTG GGG GCA GTG TTC AAT CTT ACC AGT

330

GCT GAT CAT TTA TAT GTC AAC GTA TCT GAG

360

CTC TCT CTG GTC AAT TTT GAG GAA TCT CAG

390

ACG TTT TTC GGC TTA TAT AAG CTC

414

26. 前記DNAが、下記式15（配列表の配列番号15）に記載の塩基配列を

有する請求項 2 3 に記載の新規DNA。

式 1 5

CAG CTC TTC CAC CTA CAG AAG GAG CTG GCA
30

GAA CTC CGA GAG TCT ACC AGC CAG ATG CAC
60

ACA GCA TCA TCT TTG GAG AAG CAA ATA GGC
90

CAC CCC AGT CCA CCC CCT GAA AAA AAG GAG
120

CTG AGG AAA GTG GCC CAT TTA ACA GGC AAG
150

TCC AAC TCA AGG TCC ATG CCT CTG GAA TGG
180

GAA GAC ACC TAT GGA ATT GTC CTG CTT TCT
210

GGA GTG AAG TAT AAG AAG GGT GGC CTT GTG
240

ATC AAT GAA ACT GGG CTG TAC TTT GTA TAT
270

TCC AAA GTA TAC TTC CGG GGT CAA TCT TGC
300

```

AAC AAC CTG CCC CTG AGC CAC AAG GTC TAC
                                     330
ATG AGG AAC TCT AAG TAT CCC CAG GAT CTG
                                     360
GTG ATG ATG GAG GGG AAG ATG ATG AGC TAC
                                     390
TGC ACT ACT GGG CAG ATG TGG GCC CGC AGC
                                     420
AGC TAC CTG GGG GCA GTG TTC AAT CTT ACC
                                     450
AGT GCT GAT CAT TTA TAT GTC AAC GTA TCT
                                     480
GAG CTC TCT CTG GTC AAT TTT GAG GAA TCT
                                     510
CAG ACG TTT TTC GGC TTA TAT AAG CTC
                                     537

```

27. 前記DNAが、下記式16（配列表の配列番号16）に記載の塩基配列を含有する請求項23に記載の新規DNA。

式16

```

ATG CAG CAG CCC TTC AAT TAC CCA TAT CCC
1                                     30
CAG ATC TAC TGG GTG GAC AGC AGT GCC AGC

```

60

TCT CCC TGG GCC CCT CCA GGC ACA GTT CTT

90

CCC TGT CCA ACC TCT GTG CCC AGA AGG CCT

120

GGT CAA AGG AGG CCA CCA CCA CCA CCG CCA

150

CCG CCA CCA CTA CCA CCT CCG CCG CCG CCG

180

CCA CCA CTG CCT CCA CTA CCG CTG CCA CCC

210

CTG AAG AAG AGA GGG AAC CAC AGC ACA GGC

240

CTG TGT CTC CTT GTG ATG TTT TTC ATG GTT

270

CTG GTT GCC TTG GTA GGA TTG GGC CTG GGG

300

ATG TTT CAG CTC TTC CAC CTA CAG AAG GAG

330

CTG GCA GAA CTC CGA GAG TCT ACC AGC CAG

360

ATG CAC ACA GCA TCA TCT TTG GAG AAG CAA

390

ATA GGC CAC CCC AGT CCA CCC CCT GAA AAA

420

AAG GAG CTG AGG AAA GTG GCC CAT TTA ACA

450

GGC AAG TCC AAC TCA AGG TCC ATG CCT CTG

480

GAA TGG GAA GAC ACC TAT GGA ATT GTC CTG

510

CTT TCT GGA GTG AAG TAT AAG AAG GGT GGC

540

CTT GTG ATC AAT GAA ACT GGG CTG TAC TTT

570

GTA TAT TCC AAA GTA TAC TTC CGG GGT CAA

600

TCT TGC AAC AAC CTG CCC CTG AGC CAC AAG

630

GTC TAC ATG AGG AAC TCT AAG TAT CCC CAG

660

GAT CTG GTG ATG ATG GAG GGG AAG ATG ATG

690

AGC TAC TGC ACT ACT GGG CAG ATG TGG GCC

720

CGC AGC AGC TAC CTG GGG GCA GTG TTC AAT

750

CTT ACC AGT GCT GAT CAT TTA TAT GTC AAC

780

GTA TCT GAG CTC TCT CTG GTC AAT TTT GAG

810

GAA TCT CAG ACG TTT TTC GGC TTA TAT AAG

840

CTC

843

28. 前記DNAが下記式17（配列表の配列番号17）に記載の塩基配列を含む
有する請求項23に記載の新規DNA。

式17

AGT GTG GCC CAC TTA ACA GGG AAC CCC CGC

30

TCA AGG TCC ATC CCT CTG GAA TGG GAA GAC

60

ACA TAT GGA ACT GCT TTG ATC TCT GGA GTG

90

AAG TAT AAG AAA GGC GGC CTT GTG ATC AAT

120

GAG GCT GGG TTG TAC TTC GTA TAT TCC AAA

150

GTA TAC TTC CGG GGT CAG TCT TGC AAC AGC

180

CAG CCC CTA AGC CAC AAG GTC TAT ATG AGG

210

AAC TTT AAG TAT CCT GGG GAT CTG GTG CTA

240

ATG GAG GAG AAG AAG TTG AAT TAC TGC ACT

270

ACT GGC CAG ATA TGG GCC CAC AGC AGC TAC

300

CTA GGG GCA GTA TTT AAT CTT ACC GTT GCT

330

GAC CAT TTA TAT GTC AAC ATA TCT CAA CTC

360

TCT CTG ATC AAT TTT GAG GAA TCT AAG ACC

390

TTT TTT GGC TTA TAT AAG CTT

411

29. 前記DNAが下記式18（配列表の配列番号18）に記載の塩基配列を含む請求項23に記載の新規DNA。

式 1 8

AGG AGT GTG GCC CAC TTA ACA GGG AAC CCC
30
CGC TCA AGG TCC ATC CCT CTG GAA TGG GAA
60
GAC ACA TAT GGA ACT GCT TTG ATC TCT GGA
90
GTG AAG TAT AAG AAA GGC GGC CTT GTG ATC
120
AAT GAG GCT GGG TTG TAC TTC GTA TAT TCC
150
AAA GTA TAC TTC CGG GGT CAG TCT TGC AAC
180
AGC CAG CCC CTA AGC CAC AAG GTC TAT ATG
210
AGG AAC TTT AAG TAT CCT GGG GAT CTG GTG
240
CTA ATG GAG GAG AAG AAG TTG AAT TAC TGC
270
ACT ACT GGC CAG ATA TGG GCC CAC AGC AGC
300
TAC CTA GGG GCA GTA TTT AAT CTT ACC GTT

330

GCT GAC CAT TTA TAT GTC AAC ATA TCT CAA

360

CTC TCT CTG ATC AAT TTT GAG GAA TCT AAG

390

ACC TTT TTT GGC TTA TAT AAG CTT

414

30. 前記DNAが下記式19（配列表の配列番号19）に記載の塩基配列を含有する請求項23に記載の新規DNA。

式19

CAA CTC TTT CAT CTA CAG AAG GAA CTG GCA

30

GAA CTC CGT GAG TTC ACC AAC CAC AGC CTT

60

AGA GTA TCA TCT TTT GAA AAG CAA ATA GCC

90

AAC CCC AGC ACA CCC TCT GAA ACC AAA AAG

120

CCA AGG AGT GTG GCC CAC TTA ACA GGG AAC

150

CCC CGC TCA AGG TCC ATC CCT CTG GAA TGG

180

GAA GAC ACA TAT GGA ACT GCT TTG ATC TCT

210

GGA GTG AAG TAT AAG AAA GGC GGC CTT GTG

240

ATC AAT GAG GCT GGG TTG TAC TTC GTA TAT

270

TCC AAA GTA TAC TTC CGG GGT CAG TCT TGC

300

AAC AGC CAG CCC CTA AGC CAC AAG GTC TAT

330

ATG AGG AAC TTT AAG TAT CCT GGG GAT CTG

360

GTG CTA ATG GAG GAG AAG AAG TTG AAT TAC

390

TGC ACT ACT GGC CAG ATA TGG GCC CAC AGC

420

AGC TAC CTA GGG GCA GTA TTT AAT CTT ACC

450

GTT GCT GAC CAT TTA TAT GTC AAC ATA TCT

480

CAA CTC TCT CTG ATC AAT TTT GAG GAA TCT

510

AAG ACC TTT TTT GGC TTA TAT AAG CTT

537

3 1. 前記DNAが下記式 2 0 (配列表の配列番号 2 0) に記載の塩基配列を含有する請求項 2 3 に記載の新規DNA。

式 2 0

ATG CAG CAG CCC GTG AAT TAC CCA TGT CCC

30

CAG ATC TAC TGG GTA GAC AGC AGT GCC ACT

60

TCT CCT TGG GCT CCT CCA GGG TCA GTT TTT

90

TCT TGT CCA TCC TCT GGG CCT AGA GGG CCA

120

GGA CAA AGG AGA CCA CCG CCT CCA CCA CCA

150

CCT CCA TCA CCA CTA CCA CCG CCT TCC CAA

180

CCA CCC CCG CTG CCT CCA CTA AGC CCT CTA

210

AAG AAG AAG GAC AAC ATA GAG CTG TGG CTA

240

CCG GTG ATA TTT TTC ATG GTG CTG GTG GCT

270

CTG GTT GGA ATG GGG TTA GGA ATG TAT CAA

300

CTC TTT CAT CTA CAG AAG GAA CTG GCA GAA

330

CTC CGT GAG TTC ACC AAC CAC AGC CTT AGA

360

GTA TCA TCT TTT GAA AAG CAA ATA GCC AAC

390

CCC AGC ACA CCC TCT GAA ACC AAA AAG CCA

420

AGG AGT GTG GCC CAC TTA ACA GGG AAC CCC

450

CGC TCA AGG TCC ATC CCT CTG GAA TGG GAA

480

GAC ACA TAT GGA ACT GCT TTG ATC TCT GGA

510

GTG AAG TAT AAG AAA GGC GGC CTT GTG ATC

540

AAT GAG GCT GGG TTG TAC TTC GTA TAT TCC

570

AAA GTA TAC TTC CGG GGT CAG TCT TGC AAC

600

AGC CAG CCC CTA AGC CAC AAG GTC TAT ATG

630

AGG AAC TTT AAG TAT CCT GGG GAT CTG GTG

660

CTA ATG GAG GAG AAG AAG TTG AAT TAC TGC

690

ACT ACT GGC CAG ATA TGG GCC CAC AGC AGC

720

TAC CTA GGG GCA GTA TTT AAT CTT ACC GTT

750

GCT GAC CAT TTA TAT GTC AAC ATA TCT CAA

780

CTC TCT CTG ATC AAT TTT GAG GAA TCT AAG

810

ACC TTT TTT GGC TTA TAT AAG CTT

834

3 2. 前記DNAが下記式2 1（配列表の配列番号2 1）に記載の塩基配列を含む
有する請求項2 3に記載の新規DNA。

式2 1

AGT GTG GCC CAT TTA ACA GGG AAC CCC CAC

30

TCA AGG TCC ATC CCT CTG GAA TGG GAA GAC

60

ACA TAT GGA ACC GCT CTG ATC TCT GGA GTG

90

AAG TAT AAG AAA GGT GGC CTT GTG ATC AAC

120

GAA ACT GGG TTG TAC TTC GTG TAT TCC AAA

150

GTA TAC TTC CGG GGT CAG TCT TGC AAC AAC

180

CAG CCC CTA AAC CAC AAG GTC TAT ATG AGG

210

AAC TCT AAG TAT CCT GAG GAT CTG GTG CTA

240

ATG GAG GAG AAG AGG TTG AAC TAC TGC ACT

270

ACT GGA CAG ATA TGG GCC CAC AGC AGC TAC

300

CTG GGG GCA GTA TTC AAT CTT ACC AGT GCT

330

GAC CAT TTA TAT GTC AAC ATA TCT CAA CTC

360

TCT CTG ATC AAT TTT GAG GAA TCT AAG ACC

390

TTT TTC GGC TTG TAT AAG CTT

411

3 3. 前記DNAが下記式2 2（配列表の配列番号2 2）に記載の塩基配列を含有する請求項2 3に記載の新規DNA。

式2 2

AGG AGT GTG GCC CAT TTA ACA GGG AAC CCC

30

CAC TCA AGG TCC ATC CCT CTG GAA TGG GAA

60

GAC ACA TAT GGA ACC GCT CTG ATC TCT GGA

90

GTG AAG TAT AAG AAA GGT GGC CTT GTG ATC

120

AAC GAA ACT GGG TTG TAC TTC GTG TAT TCC

150

AAA GTA TAC TTC CGG GGT CAG TCT TGC AAC

180

AAC CAG CCC CTA AAC CAC AAG GTC TAT ATG

210

AGG AAC TCT AAG TAT CCT GAG GAT CTG GTG

240

CTA ATG GAG GAG AAG AGG TTG AAC TAC TGC

270

ACT ACT GGA CAG ATA TGG GCC CAC AGC AGC

300

TAC CTG GGG GCA GTA TTC AAT CTT ACC AGT

330

GCT GAC CAT TTA TAT GTC AAC ATA TCT CAA

360

CTC TCT CTG ATC AAT TTT GAG GAA TCT AAG

390

ACC TTT TTC GGC TTG TAT AAG CTT

414

3 4. 前記DNAが下記式 2 3 (配列表の配列番号 2 3) に記載の塩基配列を含有する請求項 2 3 に記載の新規DNA。

式 2 3

CAG CTC TTC CAC CTG CAG AAG GAA CTG GCA

30

GAA CTC CGT GAG TTC ACC AAC CAA AGC CTT

60

AAA GTA TCA TCT TTT GAA AAG CAA ATA GCC

90

AAC CCC AGT ACA CCC TCT GAA AAA AAA GAG

120

CCG AGG AGT GTG GCC CAT TTA ACA GGG AAC

150

CCC CAC TCA AGG TCC ATC CCT CTG GAA TGG

180

GAA GAC ACA TAT GGA ACC GCT CTG ATC TCT

210

GGA GTG AAG TAT AAG AAA GGT GGC CTT GTG

240

ATC AAC GAA ACT GGG TTG TAC TTC GTG TAT

270

TCC AAA GTA TAC TTC CGG GGT CAG TCT TGC

300

AAC AAC CAG CCC CTA AAC CAC AAG GTC TAT

330

ATG AGG AAC TCT AAG TAT CCT GAG GAT CTG

360

GTG CTA ATG GAG GAG AAG AGG TTG AAC TAC

390

TGC ACT ACT GGA CAG ATA TGG GCC CAC ACC

420

AGC TAC CTG GGG GCA GTA TTC AAT CTT ACC

450

AGT GCT GAC CAT TTA TAT GTC AAC ATA TCT

480

CAA CTC TCT CTG ATC AAT TTT GAG GAA TCT

510

AAG ACC TTT TTC GGC TTG TAT AAG CTT

537

35. 前記DNAが下記式24（配列表の配列番号24）に記載の塩基配列を含む請求項23に記載の新規DNA。

式24

ATG CAG CAG CCC ATG AAT TAC CCA TGT CCC

30

CAG ATC TTC TGG GTA GAC AGC AGT GCC ACT

60

TCA TCT TGG GCT CCT CCA GGG TCA GTT TTT

90

CCC TGT CCA TCT TGT GGG CCT AGA GGG CCG

120

GAC CAA AGG AGA CCG CCA CCT CCA CCA CCA

150

CCT GTG TCA CCA CTA CCA CCG CCA TCA CAA

180

CCA CTC CCA CTG CCG CCA CTG ACC CCT CTA

210

AAG AAG AAG GAC CAC AAC ACA AAT CTG TGG

240

CTA CCG GTG GTA TTT TTC ATG GTT CTG GTG

270

GCT CTG GTT GGA ATG GGA TTA GGA ATG TAT

300

CAG CTC TTC CAC CTG CAG AAG GAA CTG GCA

330

GAA CTC CGT GAG TTC ACC AAC CAA AGC CTT

360

AAA GTA TCA TCT TTT GAA AAG CAA ATA GCC

390

AAC CCC AGT ACA CCC TCT GAA AAA AAA GAG

420

CCG AGG AGT GTG GCC CAT TTA ACA GGG AAC

450

CCC CAC TCA AGG TCC ATC CCT CTG GAA TGG

480

GAA GAC ACA TAT GGA ACC GCT CTG ATC TCT

510

GGA GTG AAG TAT AAG AAA GGT GGC CTT GTG

540

ATC AAC GAA ACT GGG TTG TAC TTC GTG TAT

570

TCC AAA GTA TAC TTC CGG GGT CAG TCT TGC

600

AAC AAC CAG CCC CTA AAC CAC AAG GTC TAT

630

ATG AGG AAC TCT AAG TAT CCT GAG GAT CTG

660

GTG CTA ATG GAG GAG AAG AGG TTG AAC TAC

690

TGC ACT ACT GGA CAG ATA TGG GCC CAC AGC

720

AGC TAC CTG GGG GCA GTA TTC AAT CTT ACC

750

AGT GCT GAC CAT TTA TAT GTC AAC ATA TCT

780

CAA CTC TCT CTG ATC AAT TTT GAG GAA TCT

810

AAG ACC TTT TTC GGC TTG TAT AAG CTT

36. 前記DNAが前記式16（配列表の配列番号16）に記載の塩基配列の一部である請求項23に記載の新規DNA。

37. 前記DNAが前記式20（配列表の配列番号20）に記載の塩基配列の一部である請求項23に記載の新規DNA。

38. 前記DNAが前記式24（配列表の配列番号24）に記載の塩基配列の一部である請求項23に記載の新規DNA。

39. 前記式13、17、21（配列表の配列番号13、17、21）のいずれかに記載の塩基配列に相補的な塩基配列を有するDNAとハイブリダイズし、Fasリガンドをコードすることを特徴とする新規DNA。

40. 請求項23ないし39いずれかに記載の新規DNAを含む事を特徴とする組み換えDNA分子。

41. 請求項23ないし39いずれかに記載の新規DNAで形質転換されたことを特徴とする形質転換体。

42. 請求項40に記載の組み換えDNA分子で形質転換されたことを特徴とする形質転換体。

43. 形質転換体が、下記a)ないしc)より選ばれる少なくとも1つの宿主を形質転換したものである請求項41または42いずれかに記載の形質転換体。

a) 大腸菌

b) 酵母

c) 哺乳動物細胞

44. 請求項41ないし43のいずれかに記載の形質転換体を培養し、その培養

混合物から請求項 1 ないし 2 2 のいずれかに記載の新規ポリペプチドを回収、精製することを特徴とする、請求項 1 ないし 2 2 のいずれかに記載の新規ポリペプチドの製造方法。

4 5. 請求項 1 ないし 2 2 のいずれかに記載の新規ポリペプチドを含有する試料中より該新規ポリペプチドを精製する方法であって、少なくとも、下記より選ばれるいずれか 1 つ以上の精製工程を行う事を特徴とする、請求項 1 ないし 2 2 いずれかに記載の新規ポリペプチドの精製方法。

(1) F a s 抗原を使用したアフィニティークロマトグラフィー

(2) 請求項 1 ないし 2 2 のいずれかに記載の新規ポリペプチドを認識する抗体を使用したアフィニティークロマトグラフィー

4 6. 請求項 1 ないし 2 2 いずれかに記載の新規ポリペプチドを認識することを特徴とする新規抗体。

4 7. 前記抗体がモノクローナル抗体である請求項 4 6 に記載の新規抗体。

4 8. 前記抗体がポリクローナル抗体である請求項 4 6 に記載の新規抗体。

4 9. F a s 抗原を発現する細胞のアポトーシスを抑制する効果を有する請求項 4 6 ないし 4 8 いずれかに記載の新規抗体。

5 0. F a s リガンド遺伝子の一部もしくは F a s リガンドに対する mRNA の一部に相補的な塩基配列を含むことを特徴とする、オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体。

5 1. F a s リガンドの発現を調節する請求項 5 0 に記載のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体。

5 2. F a s リガンドの発現を抑制する請求項 5 0 または 5 1 に記載のオリゴヌ

クレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体。

53. オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体が、配列表の配列番号13ないし28いずれかに記載の塩基配列に相補的な塩基配列の一部を含むオリゴヌクレオチドまたはその誘導体である請求項50ないし52いずれかに記載のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体。

54. 請求項1ないし22いずれかに記載の新規ポリペプチドもしくはそれを発現する形質転換体を使用することを特徴とする、Fasリガンドに関連する物質もしくはFas抗原に関連する物質のスクリーニング方法。

55. 請求項1ないし22いずれかに記載の新規ポリペプチドもしくはそれを発現する形質転換体およびFas抗原もしくはFas抗原を発現する細胞を使用することを特徴とする請求項54に記載のスクリーニング方法。

56. Fasリガンドに結合する物質、Fasリガンドの発現を調節する物質、Fas抗原の発現を調節する物質およびFasリガンドの標的細胞に対する作用を調節する物質からなる群より選ばれる少なくとも1つの物質をスクリーニングする請求項54または55に記載のスクリーニング方法。

57. 下記の(1)ないし(3)のいずれかより選択される工程を含む請求項54ないし56いずれかに記載のスクリーニング方法。

- (1) a. Fas抗原を発現する細胞を、請求項1ないし22いずれかに記載のポリペプチド、それを発現する形質転換体およびその培養上清からなる群より選ばれるいずれかとともに培養する。
- b. aに被験物質もしくは被験物質を含む試料を添加する。
- c. Fas抗原を発現する細胞の生死、形態的变化もしくは生化学的変

化のうち少なくともいずれか1つを測定する。

(2) a. 被験物質もしくは被験物質を含む試料を、請求項1ないし22いずれかに記載の新規ポリペプチド、それを発現する形質転換体およびその培養上清からなる群より選ばれるいずれかとインキュベートする。

b. aにFas抗原を発現する細胞を加えて、培養する。

c. Fas抗原を発現する細胞の生死、形態的变化もしくは生化学的变化のうち少なくともいずれか1つを測定する。

(3) a. 被験物質もしくは被験物質を含む試料をFas抗原を発現する細胞とインキュベートする。

b. aに、前記式1ないし22いずれかに記載の新規ポリペプチド、それを発現する形質転換体およびその培養上清からなる群より選ばれるいずれかを加えて培養する。

c. Fas抗原を発現する細胞の生死、形態的变化もしくは生化学的变化のうち少なくともいずれか1つを測定する。

FIG. 1

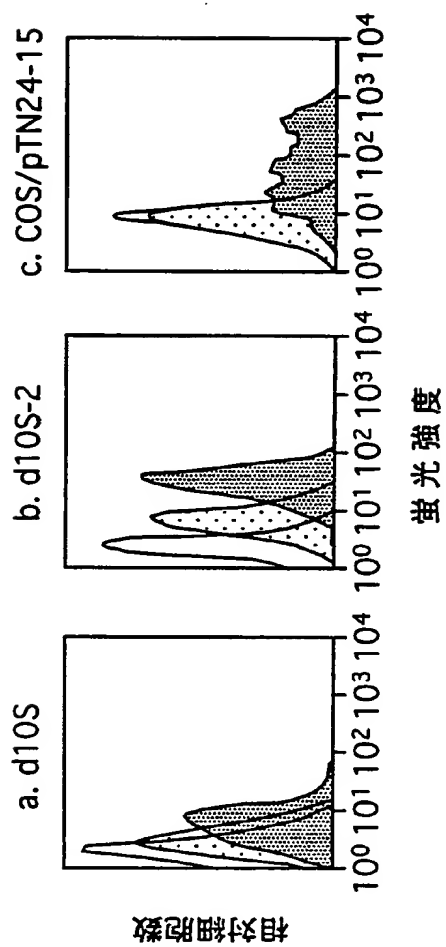


FIG. 2

TCAGAGTCTCTGCTGACACATTCAGTCTCCACAGACTGAGAGGAAACCTTTCTGGGGCTGGGTGCC
 50
 100
 ATG CAG CAG CCC GTG AAT TAC CCA TGT CCC CAG ATC TAC TGG GTA GAC AGC AGT GCC ACT TCT CCT TGG GCT CCT
 Met Gln Gln Pro Val Asn Tyr Pro Cys Pro Gln Ile Tyr Trp Val Asp Ser Ala Thr Ser Pro Trp Ala Pro
 150
 CCA GGG TCA GTT TTT TGT CCA TCC TCT GGG CCT AGA GGG CCA GGA CAA AGG AGA CCA CCG CCT CCA CCA CCA
 Pro Gly Ser Val Phe Ser Cys Pro Ser Cys Pro Ser Gly Pro Arg Gly Pro Gly Gln Arg Pro Pro Pro Pro Pro
 200
 CCT CCA TCA CCA CCA CCG CCT TCC CAA CCA CCC CCG CTG CCT CCA CTA AGC CCT CTA AAG AAG AAG GAC AAC
 Pro Pro Ser Pro Leu Pro Pro Ser Gln Pro Pro Pro Pro Leu Ser Pro Leu Lys Lys Lys Asp Asn
 250
 ATA GAG CTG TGG CTA CCG GTG ATA TTT TTC ATG GTG CTG GTG GCT CTG GTT GGA ATG GGG TTA GGA ATG TAT CAA
 Ile Glu Leu Trp Leu Pro Val Ile Phe Phe Met Val Leu Val Ala Leu Val Gly Met Gly Leu Gly Met Tyr Gln
 300
 CTC TTT CAT CTA CAG AAG GAA CTG GCA GAA CTC CGT GAG TTC ACC AAC CAC AGC CTT ACA CTA TCA TCT TTT GAA
 Leu Phe His Leu Gln Lys Glu Leu Ala Glu Leu Ala Glu Leu Arg Glu Phe Thr Asn His Ser Leu Arg Val Ser Ser Phe Glu
 350
 AAG CAA ATA GCC AAC CCC AGC ACA CCC TCT GAA ACC AAA AAG CCA AGG AGT GTG GCC CAC TTA ACA GGG AAC CCC
 Lys Gln Ile Ala Asn Pro Ser Thr Pro Ser Glu Thr Lys Lys Pro Arg Ser Val Ala His Leu Thr Gly Asn Pro
 400
 CGC TCA AGG TCC ATC CCT CTG GAA TGG GAA GAC ACA TAT GGA ACT GCT TTG ATC TCT GGA GTG AAG TAT AAG AAA
 Arg Ser Arg Ser Ile Pro Leu Glu Trp Glu Asp Thr Tyr Gly Thr Ala Leu Ile Ser Gly Val Lys Tyr Lys Lys
 450
 GGC GGC CTT GTG ATC AAT GAG GCT GGG TTG TAC TTC GTA TAT TCC AAA GTA TAC TTC CCG GGT CAG TCT TGC AAC
 Gly Gly Leu Val Ile Asn Glu Ala Gly Leu Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn
 500
 AGC CAG CCC CTA AGC CAC AAG GTC TAT ATG AGG AAC TTT AAG TAT CCT GGG GAT CTG GTG CTA ATG GAG GAG AAG
 Ser Gln Pro Leu Ser His Lys Val Tyr Met Arg Asn Phe Lys Tyr Pro Gly Asp Leu Val Leu Met Glu Glu Lys
 550
 AAG TTG AAT TAC TGC ACT ACT GGC CAG ATA TGG GCC CAC AGC TAC CTA GGG GCA GTA TTT AAT CTT ACC GTT
 Lys Leu Asn Tyr Cys Thr Thr Gly Gln Ile Trp Ala His Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Val Phe Asn Leu Thr Val
 600
 650
 700
 750
 800
 850
 900
 950
 1000

FIG. 3

850
GCT GAC CAT TTA TAT GTC AAC ATA TCT CAA CTC TCT CTG ATC AAT TTT GAG GAA TCT AAG ACC TTT TTT GGC TTA
Ala Asp His Leu Tyr Val Asn Ile Ser Gln Leu Ser Leu Ile Asn Phe Glu Ser Lys Thr Phe Phe Gly Leu
260
900
TAT AAG CTT TAA AGGAAAAAGCATTTTAGAATGATCTATTATCTTTATCATGGATGCCAGGAATATGTCTTCAATGAGAGTCTTCTTAAGACC
Tyr Lys Leu ***
950
1000
AATTGAGCCACAAAGACCACACAGGTCCCAACAGGTCCAGCTACCCCTTCATTTTCTAGAGGTCCATGGAGTGTCTTAAATGCCCTGCATCATGAGCCAGATG
1100
GGAAGAAGACTGTTCTCTGAGGAACATAAAGTTTGGGGCTGCTGTGTGGCAATGCAGAGGCAAAAGAGAGAGGAACCTGTCTGATGTTAAATGGCCCAAGAGCA
1200
TTTATGCCATTGAAGCAAAAAAACCCTTTAAACTCACCTTCCAGGGTGGGTCTACTTTGCTACCTCACAGGAGGCCGCTCTTTTAGACACATGTTCTGTGG
1300
TATGACTATACAGGGGTGAGAAAGGATGCTAGGTTTTCATGGATAAGCTAGAGACTGAAAAAAGCCAGTGTCCCATTTGGCATCATCTTTTAACTG
1400
ATGTTTCTGAGCCACCCTTTTGATGCTAACACAGAGAAATAAGAGGGGTGTTTGAGGCAAGTCTATCTCTACATAGCATGTGTACCTCCAGTGCATGA
1500
TGTCTGTGTGTTTTTATGATGAGAGTAGAGCGATTCTTAAAGAGTCACATGAGTACACCGCTACATTACGGAGTACATATTAGAAACGTTATGTGTT
1600
ACATTTGATGCTAGAAATACTGAATGTTTCTTGCTA

FIG. 4

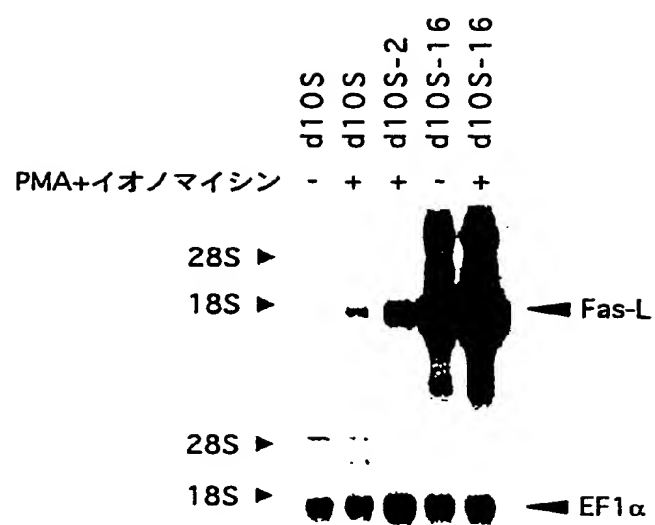


FIG. 5

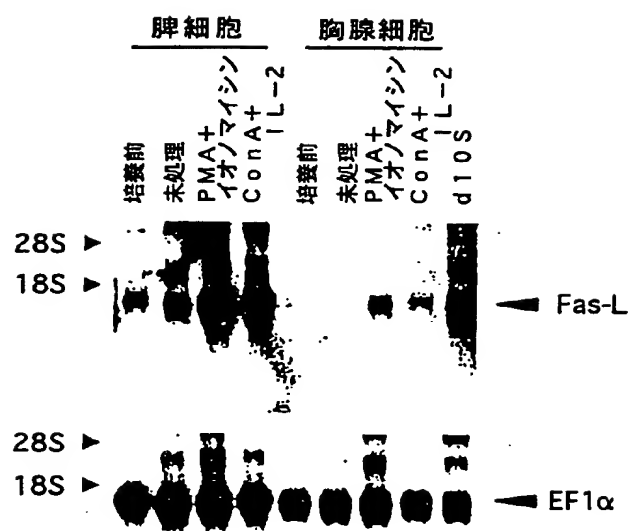


FIG. 6

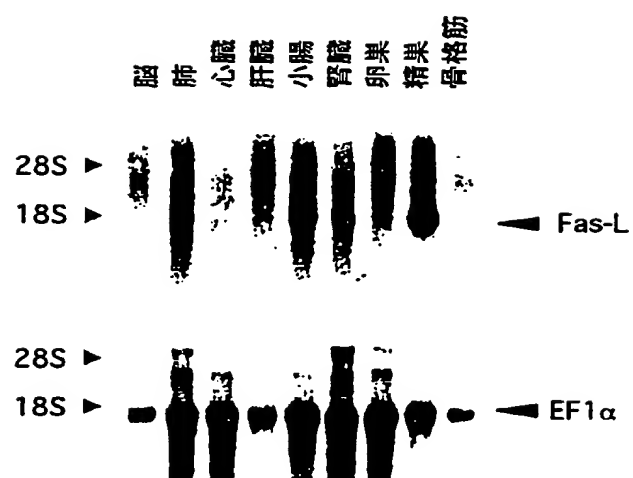


FIG. 7

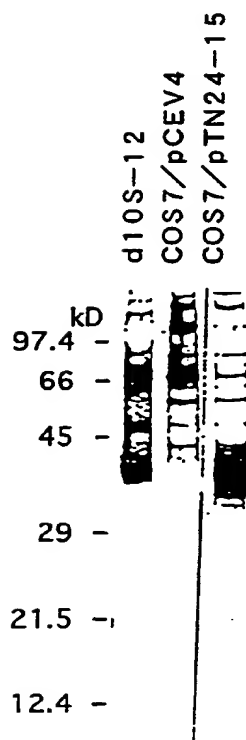
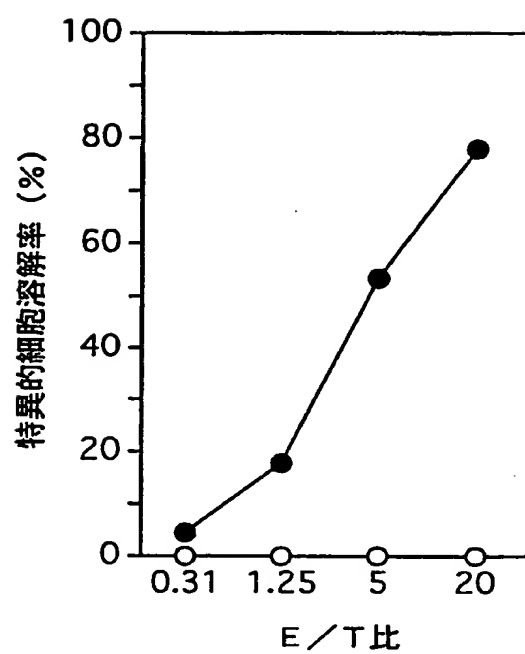


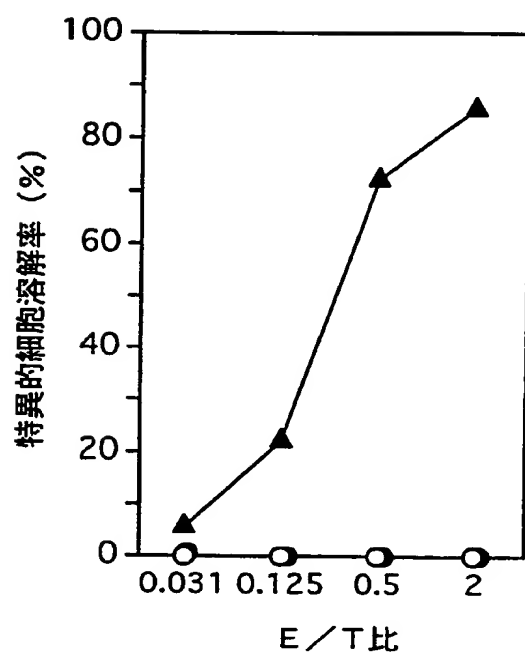
FIG. 8



● エフェクター細胞 : d10S
標的細胞 : W4

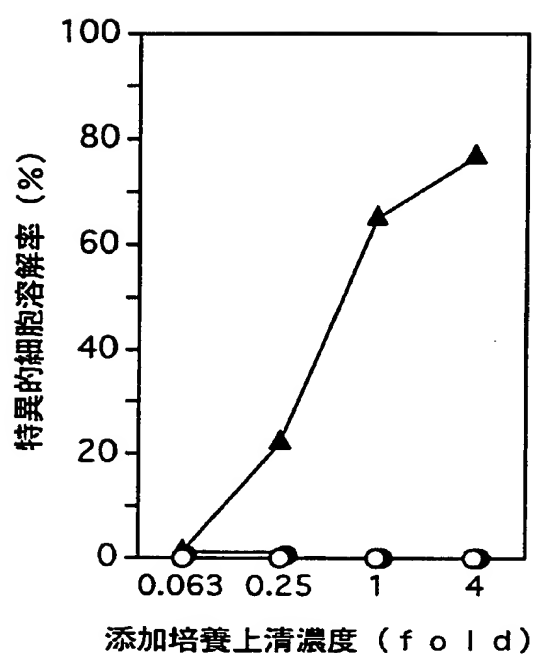
○ エフェクター細胞 : d10S
標的細胞 : WR19L

FIG. 9



- エフェクター細胞 : COS/pCEV4
標的細胞 : W4
- ▲ エフェクター細胞 : COS/pTN24-15
標的細胞 : W4
- エフェクター細胞 : COS/pTN24-15
標的細胞 : WR19L

FIG.10



- ▲ エフェクター細胞: COS/pTN24-15
標的細胞: W4
- エフェクター細胞: COS/pTN24-15
標的細胞: WR19L
- エフェクター細胞: COS/pCEV4
標的細胞: W4

FIG. 11

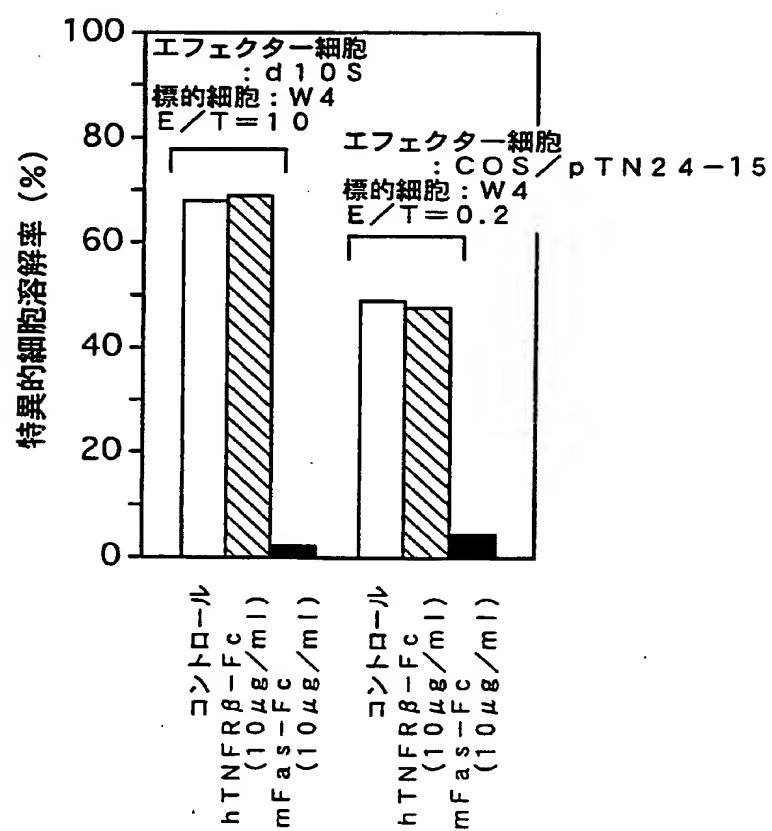


FIG. 12

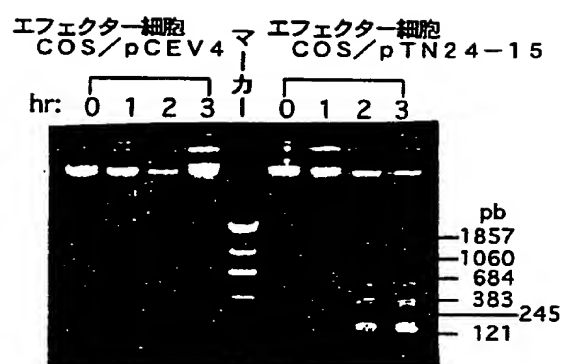


FIG.13

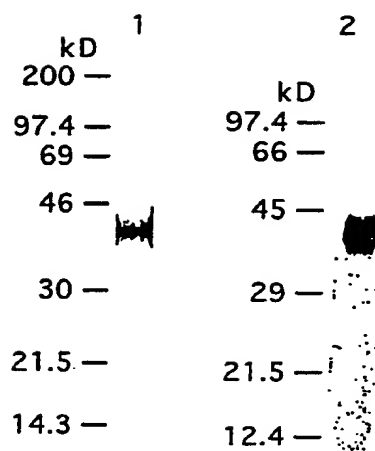
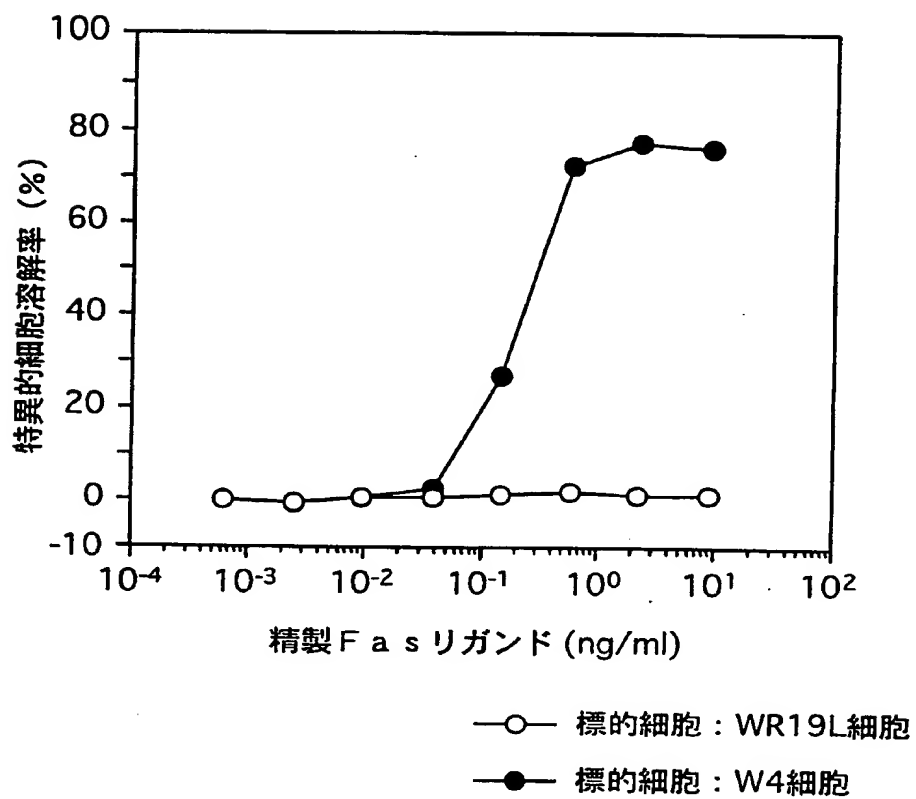


FIG. 14



16 / 41

AAATATTAATGTTATAAATAAGCATGCAATTAATTCATATAAATAATATATAGCCCCCATGACCATTTCTCTGTAGCTGGGAGCAGTTTCACACTTAACACAGGGCTTA
TACCCCCCATGCTGACCTGCTCTGACAGGATCCACAGGTAAGGTGAGCATATGCCCTACTATAACCTGTTTGGGTAGCAGCAGCAGCAACTGAGAGGCTTTGAGAGG
TGTTATCAGAAATAATGCTGGCGGAAATCTTCCAGGGGTTTCTCTGCTGAGCTTCTTGAAGCTTCTCAGCTTCAGCTGCAAAAGTCAGTGGGTGTTTCTTTTGTAG
AAGCAGAAATCAGACAGACAGACAGATGACAGAAAGAGAAAGACACAGAGGTGTTTCCCTTAGCTATATGGAATACTATAAGAGAGATCCACAGCTTGGCTCTCTCTT
AGCAGTACAGCAACAGGTTCCGTCCTTGACACCTCAGCCCTCTACAGGACTGAGAAAGAAAGTAAACCCGTTTGTGGGGCTGGCCTGACTCATCACCAGCTGGC

20

Met Gln Gln Pro Phe Asn Tyr Pro Tyr Trp Val Tyr Trp Val Asp Ser Ser Ala Ser Ser Pro Trp Ala Pro
ATC CAG CAG CCC TTC AAT TAC CCA TAT CCC CAG ATC TAC TGG GTG GAC AGC AGT GCC AGC TCT CCC TGG GCC CCT

40

Pro Gly Thr Val Leu Pro Cys Pro Thr Ser Val Pro Arg Arg Pro Gly Gln Arg Arg Pro Pro Pro Pro Pro Pro
CCA GGC ACA GTT CTT CCC TGT CCA ACC TCT GTG CCC AGA AGG CCT GGT CMA AGG AGG CCA CCA CCA CCA CCG CCA

60

Pro Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro Leu Pro Leu Pro Leu Pro Leu Lys Lys Arg Gly
CCG CCA CCA CTA CCA CCT CCG CCG CCG CCG CCA CCA CTG CCT CCA CTA CCG CTG CCA CCC CTG AAG NAG AGA GGG

80

Asn His Ser Thr Gly Leu Cys Leu Val Met Phe Met Val Leu Val Ala Leu Val Gly Leu Gly Leu Gly
AAC CAC AGC ACA GGC CTG TGT CTC CTT GTG ATG TTT TTC ATG GTT CTG GTT GCC TTG GTA GGA TTG GGC CTG GGG

*

Met Phe Gln Leu Phe His Leu Gln Lys Glu Leu Ala Glu Leu Arg Glu
ATG TTT CAG CTC TTC CAC CTA CAG NAG CAG CTG GCA GAA CTC CGA GAG GTAAAGCCTGCGGAGACAGCTGCTGTGCCCTGGAGGC

100

ACCAGGCATAGGGGATGGAGGGCCCACTCCCTGGC.....GATCTGCCCTCTTTGCTTAAGAAATTTTATTTTATATATACATCTTTCTTC

120

Ser Thr Ser Gln Met His Thr Ala Ser Ser Leu Glu Lys Gln Ile G
TTTCTCTTTTACTAG TCT ACC AGC CAG ATG CAC ACA GCA TCA TCT TTG GAG NAG CMA ATA G CTGAGTCTTTTTTTCGCTGTA

140

CTATGAGTTCCCAAGAGATNTCTCAGCAGCAGAACTATGTTAATGGAAATGCTTAATAATTCGTGTCACACACTTGGTTCTGTTACACTATTAAGAGGAATTA

FIG. 17

CTTCCACCCAAATATAGTTCCTATTTCATTTTACATATATTTTCCCTCTCTCTATGATACAG
 140
 ly His Pro Ser Pro Glu Lys Lys Glu Arg Lys Val Ala His Leu Thr G
 GC CAC CCC AGT CCA CCC CCT GAA AAA AAG GAG CTG AGG AAA GTG GCC CAT TTA ACA G GTCGTATC
 TCGAAGGTACAGGTGAGAT.....CTCCAGGTGAGAGATGACACAGATGCTCCCTAAGATGCTTCCCAACTTTAGAGTTC
 CTGGATTTGGCTTTTCTTCAGGAAAGGACCTTCAMAGCCCTAGCAGATTTTGGTGTAGTTCCTGAAGATAGTAAATCTTTGTTCCAGAGAGCAATAT
 TTCTCAATAATTTCTTACTGCAATGATGAGGGTATATATCTTCCAAATGCTGATGACAAATAGGACAAAGTTCTGTTGAGGAAATCTCTGTG
 ATCGATCAGTTCGTGACCCCTCAGGCCAGTCTATACCAAGCTGTCTATCTGGGTGAAACATTTGTTGTMAGGAAGGCCACACAGTTTTCCTTAGAAACTT
 160
 ly Lys Ser Asn Ser Arg Ser Met Pro Leu Glu
 AGTTTGTGGATGCATGACTATTCCTTGTGTAAGCTCCTTTTGGATTTATTCAG GC AAG TCC AAC TCA AGG TCC ATG CCT CTG GAA
 180
 Trp Glu Asp Thr Tyr Gly Ile Val Leu Ser Gly Val Lys Tyr Lys Lys Gly Leu Val Ile Asn Glu Thr
 TCG GAA GAC ACC TAT GGA ATT GTC CTG CTT TCT GGA GTG AAG TAT AAG AAG GGT GCC CTT GTG ATC AAT GAA ACT
 200
 Gly Leu Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn Leu Pro Leu Ser His Lys Val
 GGC CTC TAC TTT GTA TAT TCC AAA GTA TAC TTC CGG GGT CAA TCT TGC AAC AAC CTG CCC CTG AGC CAC AAG CTC
 220
 Tyr Met Arg Asn Ser Lys Tyr Pro Gln Asp Leu Val Met Met Glu Gly Lys Met Ser Tyr Cys Thr Thr Gly
 TAC ATG AGG AAC TCT AAG TAT CCC CAG GAT CTG GTG ATG ATG GAG GGG AAG ATG AGC TAC TGC ACT ACT GCG
 240
 Gln Met Trp Ala Arg Ser Tyr Leu Gly Ala Val Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp His Leu Tyr Val Asn Val
 CAG ATG TGG GCC CGC AGC ACC TAC CTG GGG GCA GTG TTC AAT CTT ACC AGT GAT CAT TTA TAT GTC AAC GTA
 260
 Ser Glu Leu Ser Leu Val Asn Phe Glu Glu Ser Gln Thr Phe Phe Gly Leu Tyr Lys Leu
 TCT GAG CTC TCT CTG GTC AAT TTT GAG GAA TCT CAG ACC TTT TTC GGC TTA TAT AAG CTC TAA CAGAAAGCACTTTGGG
 280

ATTCCTTTCGATTATGATPTCTTGTATCAGGCACCGAGAAATGTTGATTTATCATGAGGCTCTCTTATCATGCTNTTTGAGGTCAGATAGAGACATGTAACC
AAGTGGACCTTGAAGCACAGGGTTTCNAATGTCCTGATGCTCTCACTCACTATATGTTTTATGAGCCAGACAAATGGAGGNAATATGACCGGAAGACAT
AGAACTCTGGGCTGCCNTGTGAGAGGGGAGAGCATGNAAGAGCTACCAGGTGTTCACTCATCTTATGTCCTGAGAGTATTTTAGGCAGATTGA
AAGGACACCC

FIG. 19

CTACAGGACT GAGAGAAGT AAAACCGTTT GCTGGGGGTG GCGTGACTCA CCAAGCTGCC

10 Met Gln Gln Pro Phe Asn Tyr Pro Tyr Pro Gln Ile Tyr Trp Val Asp Ser Ser Ala Ser
ATG CAG CAG CCC TTC AAT TAC CCA TAT CCC CAG ATC TAC TGG GTG GAC AGC AGT GGC AGC

20 Ser Pro Trp Ala Pro Pro Gly Thr Val Leu Pro Cys Pro Thr Ser Val Pro Arg Arg Pro
TCT CCC TGG GCC CCT CCA GGC ACA GTT CTT CCC TGT CCA ACC TCT GTG CCC ACA AGG CCT

30 Gly Gln Arg Arg Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro
GGT CAA AGG AGG CCA CCA CCA CCA CCG CCA CCG CCA CTA CCA CCT CCG CCG CCG CCG

40 Pro Pro Leu Pro Pro Leu Pro Pro Leu Lys Lys Arg Gly Asn His Ser Thr Gly
CCA CCA CTG CCT CCA CTA CCG CTG CCA CCC CTG AAG AAG AGA GGG AAC CAC AGC ACA GGC

50 Leu Cys Leu Leu Val Met Phe Phe Het Val Leu Val Ala Leu Val Gly Leu Gly Leu Gly
CTG TGT CTC CTT GTG ATG TTT TTC ATG GTT CTG GTT GCC TTG GTA GGA TTG GGC CTG GGC

60 Met Phe Gln Leu Phe His Leu Gln Lys Lys Glu Leu Ala Glu Leu Arg Glu Ser Thr Ser Gln
ATG TTT CAG CTC TTC CAC CTA CAG AAG GAG CTG GCA GAA CTC CGA GAG TCT ACC AGC CAG

70 Met His Thr Ala Ser Ser Leu Glu Lys Gln Ile Gly His Pro Ser Pro Pro Pro Glu Lys
ATG CAC ACA GCA TCA TCT TTG GAG AAG CAA ATA GGC CAC CCC AGT CCA CCC CCT GAA AAA

80 Lys Glu Leu Arg Lys Val Ala His Leu Thr Gly Lys Ser Asn Ser Arg Ser Met Pro Leu
AAG GAG CTG AGG AAG AAA GTG GCC CAT TTA ACA GGC AAG TCC AAC TCA AGG TCC ATG CCT CTG

FIG. 20

```

170      Glu Trp Glu Asp Thr Tyr Gly Ile Val Leu Ser Gly Val Lys Tyr Lys Lys Gly Gly
      GAA TGG GAA GAC ACC TAT GGA ATT GTC CTG CTT TCT GGA GTG AAG TAT AAG AAG GGT GGC
180
190      Leu Val Ile Asn Glu Thr Gly Leu Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln
      CTT GTG ATC AAT GAA ACT GGG CTG TAC TTT GTA TAT TCC AAA GTA TAC TTC CGG GGT CAA
200
210      Ser Cys Asn Asn Leu Pro Leu Ser His Lys Val Tyr Met Arg Asn Ser Lys Tyr Pro Gln
      TCT TGC AAC AAC CTG CCC CTG AGC CAC AAG GTC TAC ATG AAG AAC TCT AAG TAT CCC CAG
220
230      Asp Leu Val Met Met Glu Gly Lys Met Met Ser Tyr Cys Thr Thr Gly Gln Met Trp Ala
      GAT CTG GTG ATG ATG GAG GGG AAG ATG ATG AGC TAC TGC ACT ACT GGG CAG ATG TGG GCC
240
250      Arg Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Val Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp His Leu Tyr Val Asn
      CGC AGC AGC TAC CTG GGG GCA GTG TTC AAT CTT ACC AGT GCT CAT TTA TAT GTC AAC
260
270      Val Ser Glu Leu Ser Leu Val Asn Phe Glu Glu Ser Gln Thr Phe Phe Gly Leu Tyr Lys
      GTA TCT CAG CTC TCT CTG GTC AAT TTT GAG GAA TCT CAG ACG TTT TTC GGC TTA TAT AAG
280
      Leu
      CTC TAA GAGAGCACATTGGGATTC

```


FIG. 21

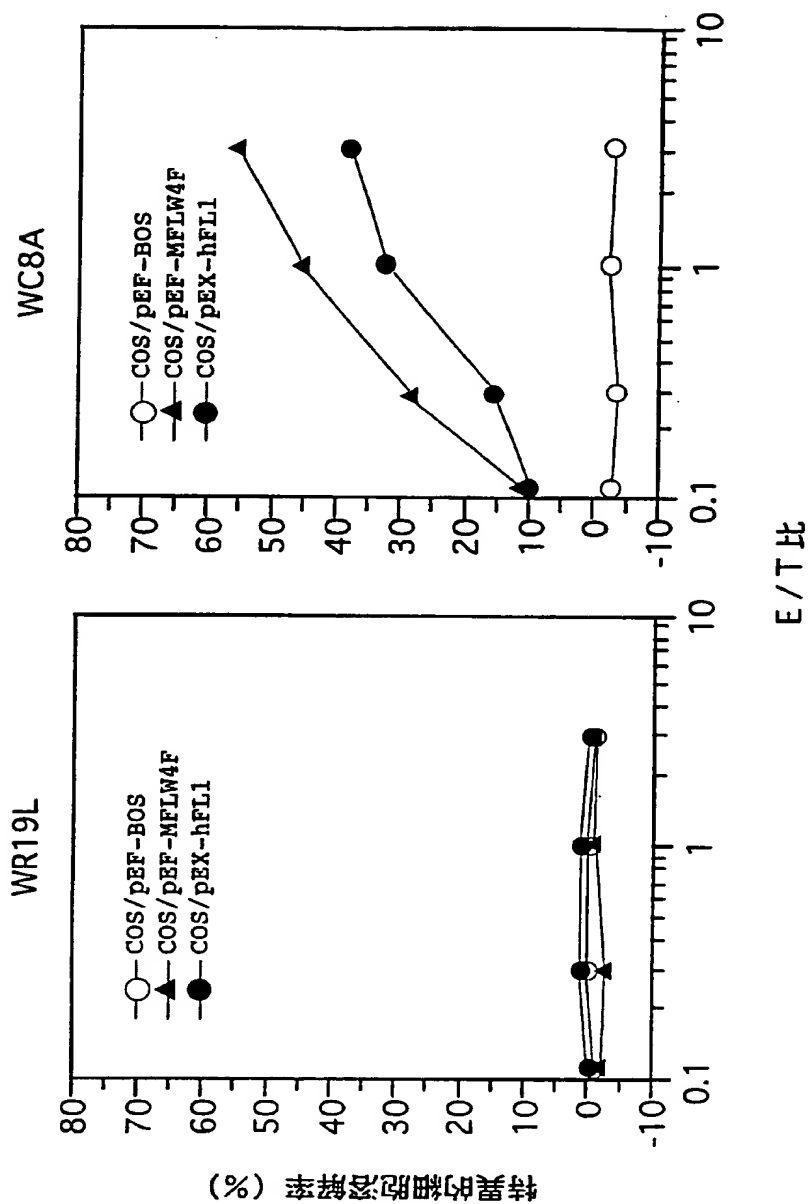


FIG. 22

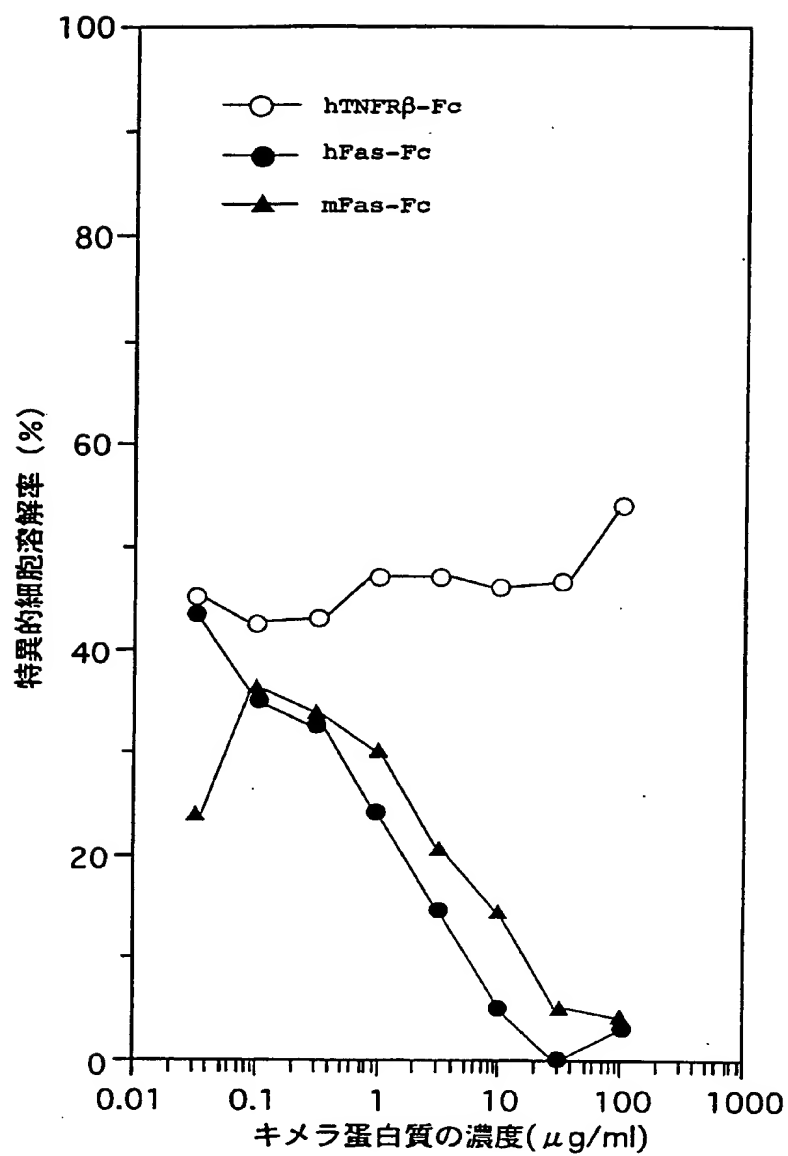


FIG. 23

CTCGGAAACTTTATTAAGAAACT

TAGCTTCTCTGGACAGTCAGCGTCAGAGTTCTGTCTCTTGACACCTGAGCTCTCTCCACAGGCTGTGAGAAAGAAACCCCTTTCCTGGGCTGGGTGCC

ATG CAG CAG CCC ATG AAT TAC CCA TGT CCC CAG ATC TTC TGG GTA GAC AGC AGT GCC ACT TCA TCT TGG GCT CCT
Met Gln Gln Pro Met Asn Tyr Pro Cys Pro Gln Ile Phe Tdp Val Asp Ser Ser Ala Thr Ser Ser Trp Ala Pro

CCA GGG TCA GTT TTT CCC TGT CCA TCT TGT GGG CCT AGA GGG CCG GAC CAA AGG AGA CCG CCA CCT CCA CCA CCA
Pro Gly Ser Val Phe Pro Cys Pro Ser Cys Gly Pro Arg Gly Pro Asp Gln Arg Arg Pro Pro Pro Pro Pro Pro

CCT GTG TCA CCA CTA CCA CCG CCA TCA CAA CCA CTC CCA CTG CCG CCA CTG ACC CCT CTA AAG AAG AAG GAC CAC
Pro Val Ser Pro Leu Pro Pro Pro Ser Gln Pro Leu Pro Leu Pro Leu Thr Pro Leu Lys Lys Lys Asp His

AAC ACA AAT CTG TGG CTA CCG GTG GTA TTT TTC ATG GTT CTG GTG GCT CTG GTT GGA ATG GGA TTA GGA ATG TAT
Asn Thr Asn Leu Trp Leu Pro Val Val Phe Phe Met Val Leu Val Ala Leu Val Gly Met Gly Leu Gly Met Tyr

CAG CTC TTC CAC CTG CAG AAG GAA CTG GCA GAA CTC CGT GAG TTC ACC AAC CAA AGC CTT AAA GTA TCA TCT TTT
Gln Leu Phe His Leu Gln Lys Lys Glu Leu Ala Glu Leu Arg Glu Phe Thr Asn Gln Ser Leu Lys Val Ser Ser Phe

GAA AAG CAA ATA GCC AAC CCC AGT ACA CCC TCT GAA AAA AAA GAG CCG AGG AGT GTG GCC CAT TTA ACA GGG AAC
Glu Lys Gln Ile Ala Asn Pro Ser Thr Pro Ser Glu Lys Lys Glu Pro Arg Ser Val Ala His Leu Thr Gly Asn

CCC CAC TCA AGG TCC ATC CCT CTG GAA TGG GAA GAC ACA TAT GGA ACC GCT CTG ATC TCT GGA GTG AAG TAT AAG
Pro His Ser Arg Ser Ile Pro Leu Glu Trp Glu Asp Thr Tyr Gly Thr Ala Leu Ile Ser Gly Val Lys Tyr Lys

AAA GGT GGC CTT GTG ATC AAC GAA ACT GGG TTG TAC TTC GTG TAT TCC AAA GTA TAC TTC CGG GGT CAG TCT TGC
Lys Gly Gly Leu Val Ile Asn Glu Thr Gly Leu Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys

FIG. 24

AAC AAC CAG CCC CTA AAC CAC AAC AAG GTC TAT ATG AGG AAC TCT AAG TAT CCT GAG GAT CTG GTG CTA ATG GAG GAG GAG
Asn Asn Gln Pro Leu Asn His Lys Val Tyr Met Arg Asn Ser Lys Tyr Pro Glu Asp Leu Val Leu Met Glu Glu

AAG AGG TTG AAC TAC TGC ACT ACT GGA CAG ATA TGG GCC CAC AGC AGC TAC CTG GGG GCA GTA TTC AAT CTT ACC
Lys Arg Leu Asn Tyr Cys Thr Thr Gly Gln Ile Tlp Ala His Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Val Phe Asn Leu Thr

ACT GCT GAC CAT TTA TAT GTC AAC ATA TCT CAA CTC TCT CTG ATC AAT TTT GAG GAA TCT AAG ACC TTT TTC GGC
Ser Ala Asp His Leu Tyr Val Asn Ile Ser Gln Leu Ser Leu Ile Asn Phe Glu Glu Ser Lys Thr Phe Phe Gly

TTC TAT AAG CTT TAA AAGAAAAAGCATTTTTAAATGATCTACTATTTCTTATCATGGGGCACCAGGAATATTTGCTCTTGAATGAGAGCTTCTTAA
Leu Tyr Lys Leu

GACCTATTGAGATTTAATTAAAGACTATAGCCACCAAGACCCTCATGACCCGCAAGGTCCAAACAGGTCAGCTATCCTTTCATTTTCTCGAGGCTCCATGGAG

TCGTCCCTTAATGCCCTGCATCATGAGCCAGATGGAGGAGGCTCTGTGACTGAGGGACATTAAGCCTTGGGCTGCTGTGTGACAAATGACAGGCACACAGA

AAGAACTCTCTGATGTTAAATGGCCAGAGAAATTTTAAACCATGTGAG-----AAGACACCTTTACACTCA-CTTCCAGGGTGGGTCTACTTACTACCTCA

CAG-AGGCCGGTTTIGAGACATA--GTTGTGGTATGCAATATATACAAAGGCTGAGAAAGGAGGCT-CATTTGACTGATTAAGCTAGAGACTGAAATAAAGACA

GTGTCTCATTTGGCACCCTTTTACTGTACCTAATGTTTTCAGCCGACCTTTGATCCTTAACGGAGAGTAAAGAGGGATGTTTGAGGCACAAATCATTT

CTCTACATAGCATGCNTACCTCCAGTGCATGATGTCGTGTGTCT--TTGTATGTATGAGAGCCAAACAGATTTCTAAGGAGTCTATATAAATAAATAATATGTA

CATTTATGAGAGTACATATTTAGAAACC-----TCTTACATTTGATCTAGTA-TATCTGATATGTTTCTTGGCCAAATAAACCTCTAATATAGTCT

24/41

FIG.25

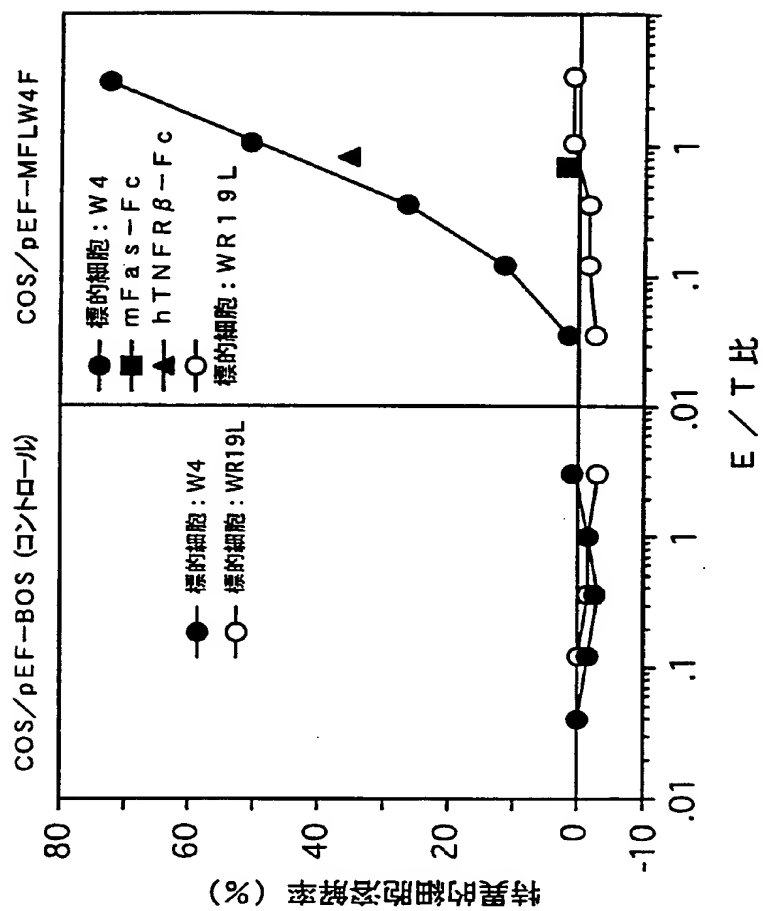


FIG.26

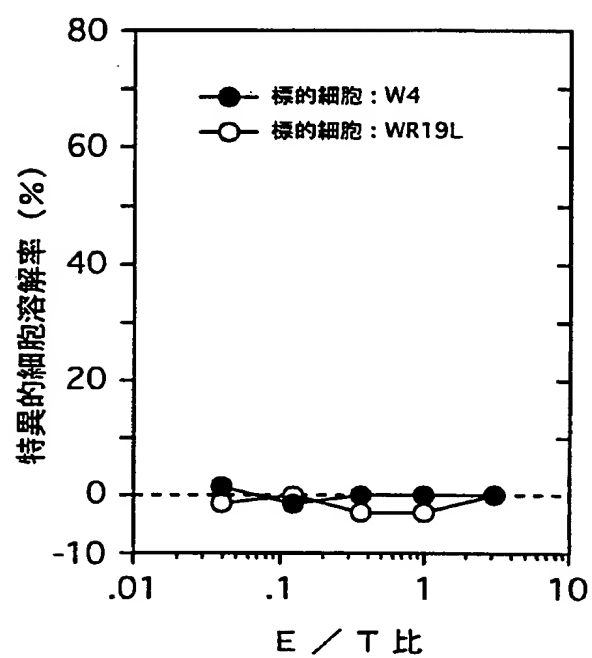


FIG. 27

コントロール
マウスにのみ発生細胞
ヒトにのみ発生細胞



FIG.28

ヒトFasリガンド発現細胞
マウスFasリガンド発現細胞
コントロール

FIG. 29

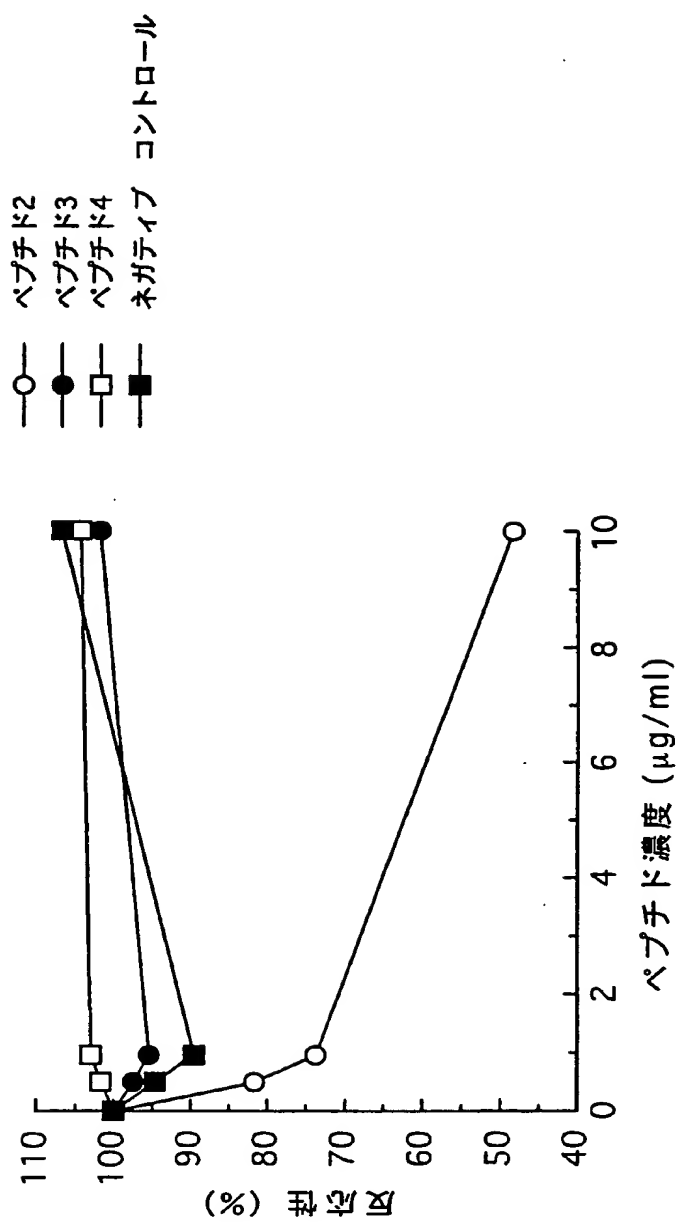


FIG. 30

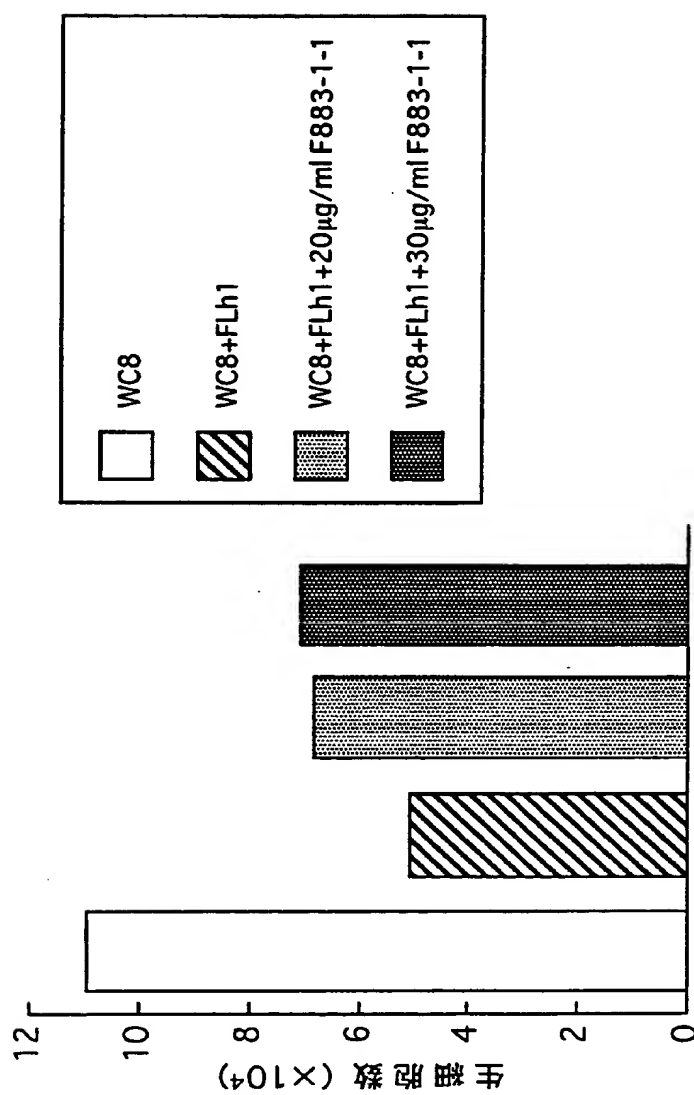


FIG. 31

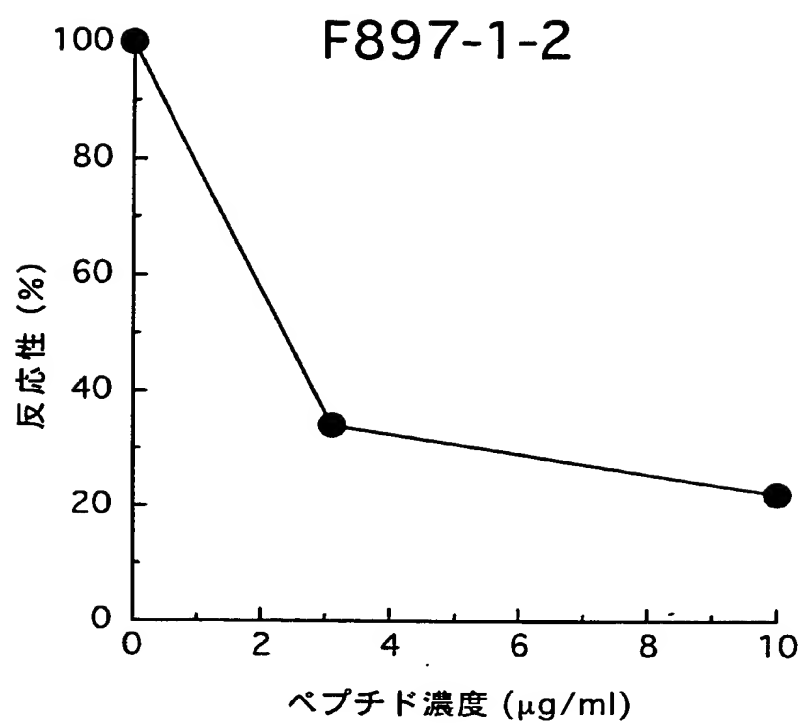


FIG. 32

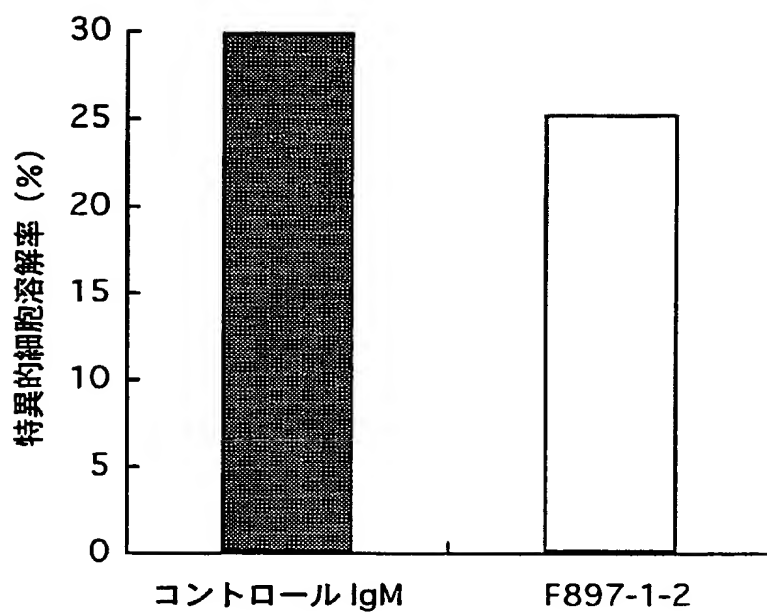


FIG. 33

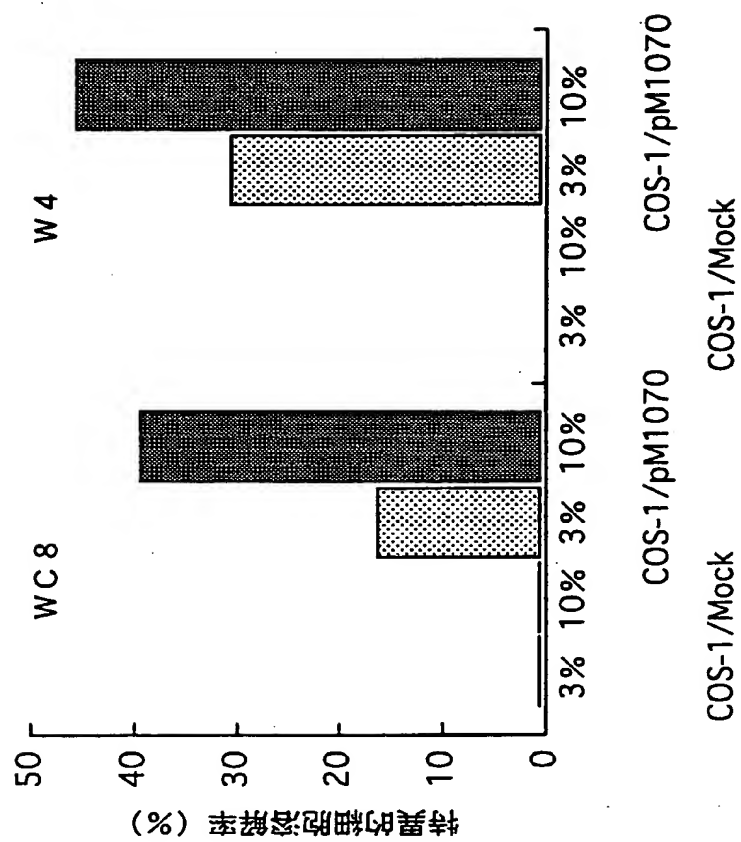


FIG. 34

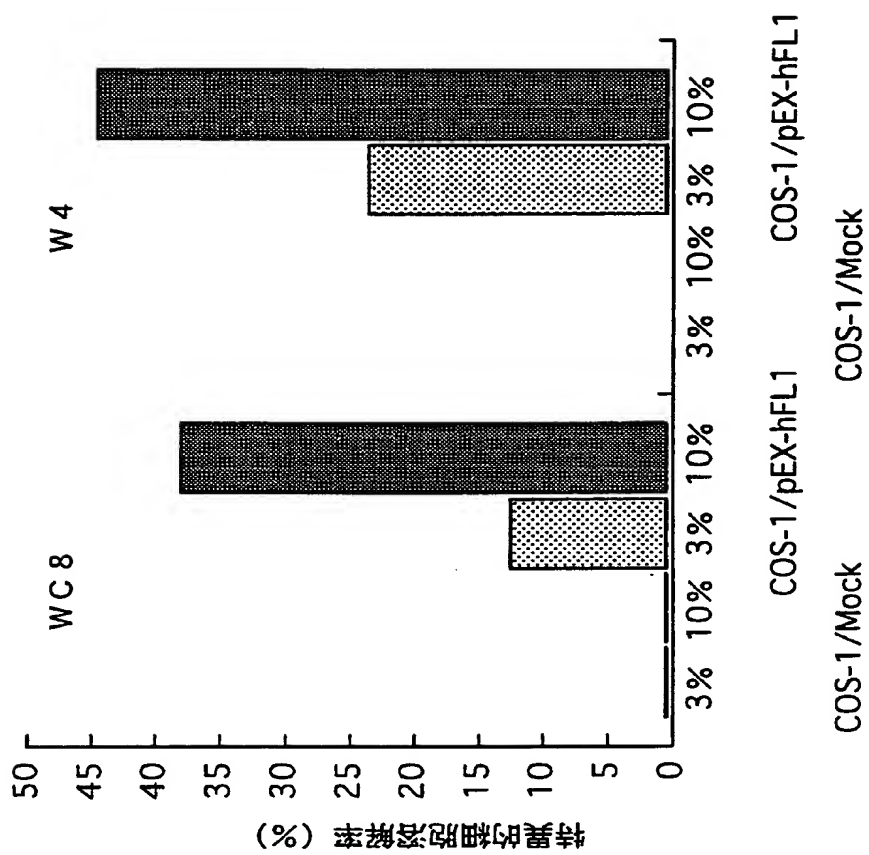


FIG. 35

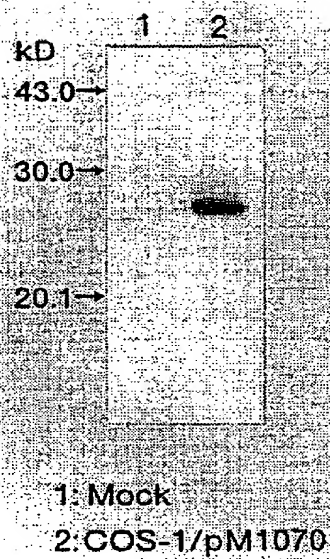
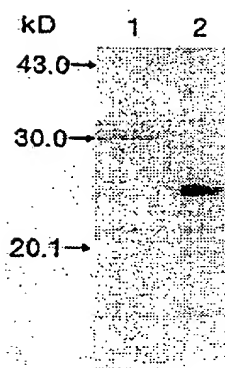


FIG. 36



1: Mock

2: COS-1/pEX-hFL1

FIG. 37

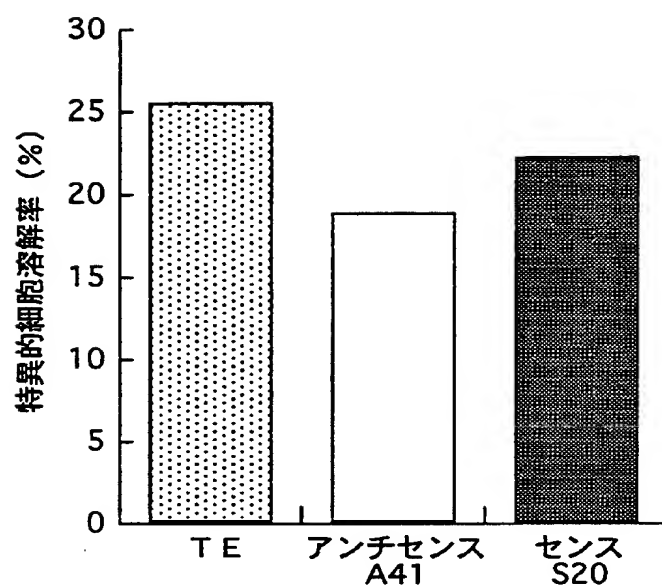


FIG. 38

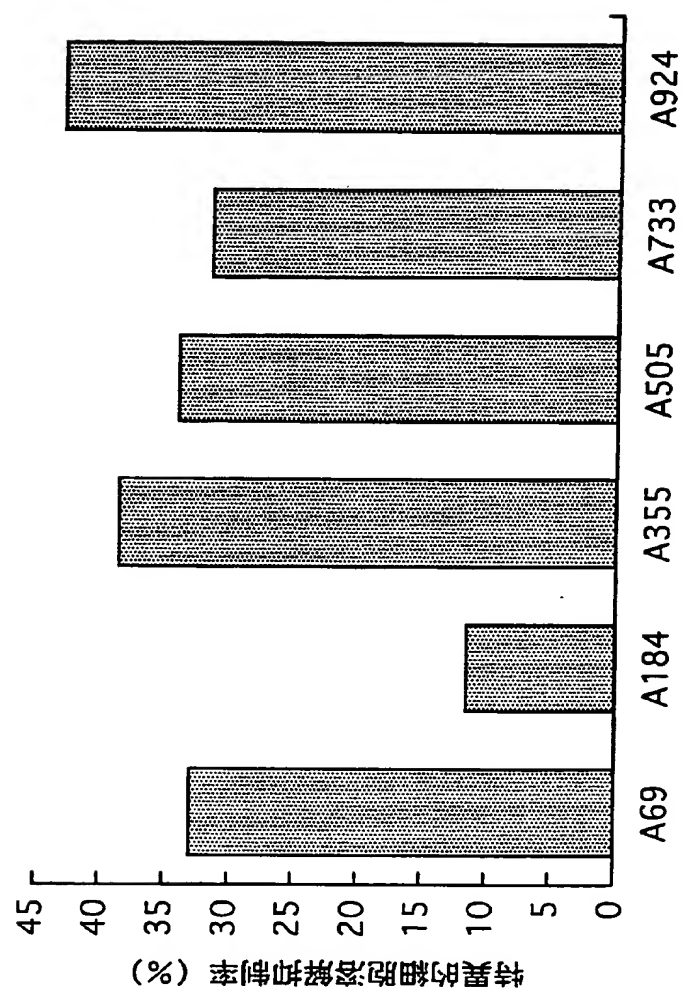
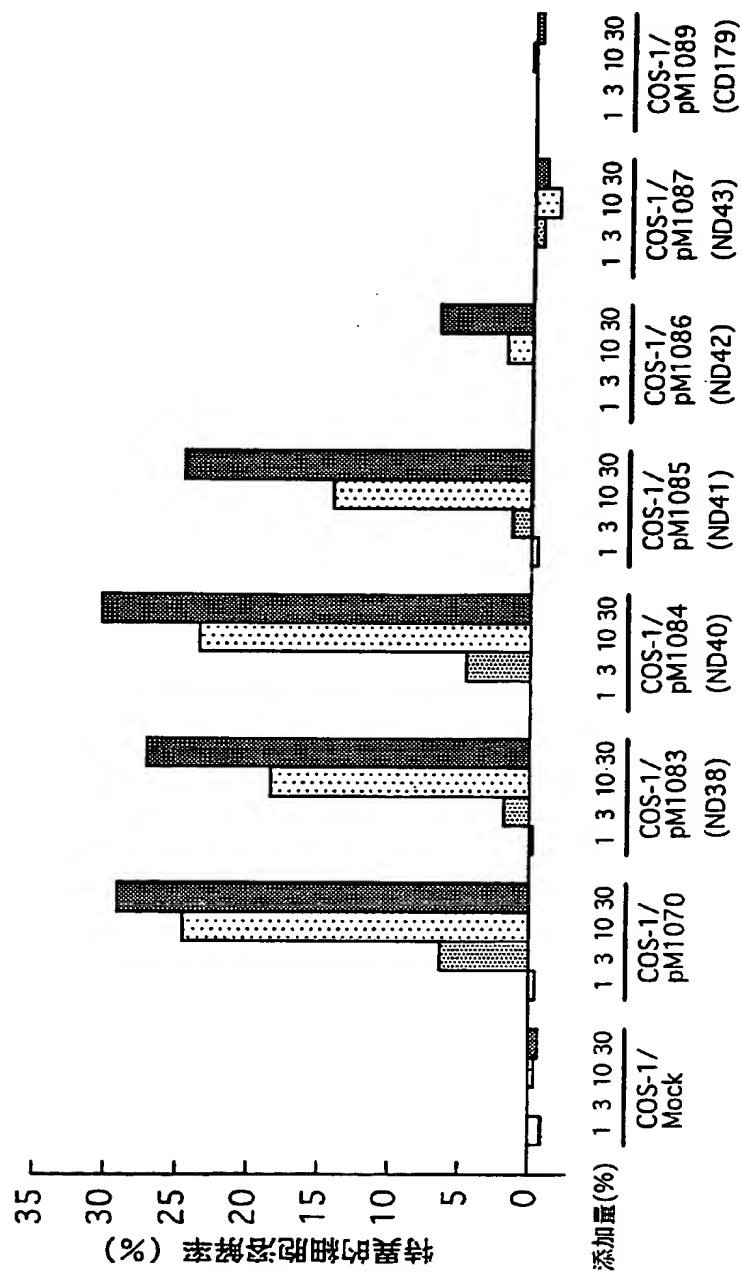
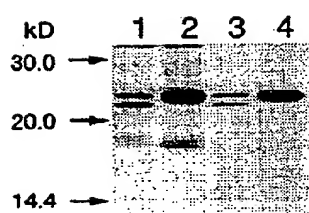


FIG. 39



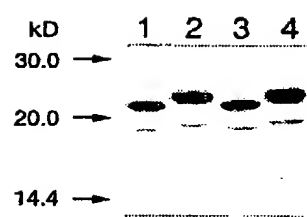
各変異体の培養上清濃度

FIG. 40



1 : JE5505(pM1068) 菌体 DTT(-)
2 : JE5505(pM1068) 菌体 DTT(+)
3 : JE5505(pM1068) 上清 DTT(-)
4 : JE5505(pM1068) 上清 DTT(+)

FIG. 41



1 : JE5505(pM1069) 菌体 DTT(-)
2 : JE5505(pM1069) 菌体 DTT(+)
3 : JE5505(pM1069) 上清 DTT(-)
4 : JE5505(pM1069) 上清 DTT(+)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/01899

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C07K14/52, C12N15/00, C12N1/21, C12N1/19, C12N5/00,
C12P21/02, C07K16/24

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C07K14/52, C12N15/00, C12N1/21, C12N1/19, C12N5/00,
C12P21/02, C07K16/24

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE, BIOSIS PREVIEWS, WPI, WPI/L

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Cell, Vol. 75, No. 6 (1993) T. Suda, et al. "Molecular cloning and expression of the fas ligand a novel member of the tumor necrosis factor family" P. 1169-1178	1-57
P, X	Cell, Vol. 76, No. 6 (1994) T. Takahashi, et al. "Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the fas ligand" P. 969-976	1-57
P, X	International Immunology, Vol. 6, No. 10 (1994) T. Takahashi et al. "Human Fas ligand: Gene structure, chromosomal location and species specificity" P. 1567-1574	1-57
P, X	Journal of Experimental Medicine, Vol. 179, No. 3 (1994) T. Suda, et al. "Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis" P. 873-879	1-57

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"T" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

January 23, 1995 (23. 01. 95)

Date of mailing of the international search report

February 7, 1995 (07. 02. 95)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP94/01899

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Immunity, Vol. 1, No. 2 (1994) D. H. Lynch, et al. "The mouse Fas-ligand gene is mutated in gld mice and is part of a TNF family gene cluster" P. 131-136	1-57
A	Journal of Experimental Medicine, Vol. 177, No. 1 (1993) E. Rouvier, et al. "Fas involvement in calcium independent T cell-mediated cytotoxicity" P. 195-200	1-57

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC)) Int. Cl. ⁸ C07K14/52, C12N15/00, C12N1/21, C12N1/19, C12N5/00, C12P21/02, C07K16/24		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC)) Int. Cl. ⁸ C07K14/52, C12N15/00, C12N1/21, C12N1/19, C12N5/00, C12P21/02, C07K16/24 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用了電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語) CAS ONLINE, BIOSIS PREVIEWS, WPI. WPI/L		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	Cell, 第75巻, 第6号(1993) T. Suda, et al. 「Molecular cloning and expression of the fas ligand a novel member of the tumor necrosis factor family」 p. 1169-1178	1-57
P, X	Cell, 第76巻, 第6号(1994) T. Takahashi, et al. 「Generalized lymphoproliferative disease in mice. caused by a point mutation in the fas ligand」 p. 969-976	1-57
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日 の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と 矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため に引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規 性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文 献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性 がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 23.01.95	国際調査報告の発送日 07.02.95	
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 植野 浩 志 ㊞	4 B 9 2 8 1
電話番号 03-3581-1101 内線		3449

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	International Immunology, 第6巻, 第10号 (1994) T. Takahashi et al. 「 Human Fas ligand : Gene structure, chromosomal location and species specificity 」 p. 1567-1574	1-57
P, X	Journal of Experimental Medicine, 第179巻, 第3号(1994) T. Suda, et al. 「 Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis 」 p. 873-879	1-57
P, X	Immunity, 第1巻, 第2号(1994) D. H. Lynch, et al. 「 The mouse Fas-ligand gene is mutated in gld mice and is part of a TNF family gene cluster 」 p. 131-136	1-57
A	Journal of Experimental Medicine, 第177巻, 第1号(1993) E. Rouvier, et al. 「 Fas involvement in calcium independent T cell- mediated cytotoxicity 」 p. 195-200	1-57